



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DE DERIVADOS
ÉSTERES DO ÁCIDO GÁLICO.**

ROBER ROSSO

Florianópolis – Santa Catarina – Brasil

Setembro de 2005

ROBER ROSSO

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DE DERIVADOS
N-ALQUIL-ÉSTERES DO ÁCIDO GÁLICO.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de **MESTRE EM FARMÁCIA**. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos/Análises Clínicas.

Orientadora: Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski-Pasa

**Florianópolis
2005**

**“...às vezes, um simples balançar das
asas de uma borboleta pode causar
um tufão no outro lado do mundo...”**

(teoria do caos)

“Durante um espetáculo, um enorme elefante faz demonstrações de força descomunais. Mas, antes de entrar em cena, permanece preso, quieto, contido somente por uma corrente que aprisiona uma de suas patas a uma pequena estaca cravada no solo.

A estaca é só um pequeno pedaço de madeira. E, ainda que a corrente fosse grossa, ele, capaz de derrubar uma árvore com sua própria força, poderia, com facilidade, arrancá-la do solo e fugir.

Que mistério! Por que o elefante não foge?

O elefante do circo não escapa porque foi preso à estaca ainda muito pequeno. O elefantinho puxava, forçava, tentava se soltar, e, apesar de todo o esforço, não conseguia sair. A estaca era muito pesada para ele. Ele tentava, tentava e fracassava. Até que um dia, cansado, aceitou o seu destino: ficar amarrado na estaca, balançando o corpo de lá para cá, eternamente, esperando a hora de entrar no espetáculo. “

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e que não estão citados.

À Profa. Tânia Beatriz Creczynski Pasa por ser, mais do que orientadora, uma parceira atenta de seus alunos, que vive passionadamente cada etapa do trabalho do grupo, inspirando a todos com sua autenticidade. Obrigada por tanto aprendizado! Um sincero agradecimento por ter me acolhido no momento em que me encontrava desacreditado. Um agradecimento às festas realizadas em sua casa (como se esquecer da feijoada e da festa com os gringos).

Ao Prof. André Pasa (chefe interino), parceiro de festas e jogos da seleção (além de ser colorado), pela sua amizade e coleguismo, e ao seu grupo de trabalho, pelo apoio e dedicação oferecidos durante o processo de realização deste trabalho.

À Profa. Fátima Regina Mena Barreto Silva, pela sua colaboração e por fornecer os animais utilizados neste trabalho.

Ao grupo do Prof. Rosendo A. Yunes, e seu aluno Paulo C. Leal, que sintetizaram os galatos utilizados neste trabalho.

Aos Professores membros da banca, Antônio Pereira, Elenara Maria Teixeira Lemos Senna e Flávio Henrique Reginatto, cujo exemplo e profissionalismo inspiram toda a minha confiança em entregar-lhes este trabalho para avaliação.

Aos meus pais, Orir e Ivante, que sempre me apoiaram, me entusiasmaram e não me deixaram fraquejar nas horas mais difíceis (e que não foram poucas). Um sincero agradecimento pelo apoio moral e financeiro (e que não foi pequeno, pois não é fácil sustentar um marmanjo em Florianópolis por dois anos).

À minha irmã e à minha tia Lucia, que sempre me apoiaram e me ajudaram a segurar a barra com a mamãe quando eu pisava na bola (e foram muitas vezes). Um

agradecimento especial à Karine, que mesmo de longe sempre esteve perto de mim, me apoiando e me incentivando.

Aos meus amigos (e colegas) do Laboratório de Bioenergética e Bioquímica de Macromoléculas Csele, Heloísa, Melina, Mirela, Sântia e Claudriana pelo ótimo astral e ambiente de trabalho proporcionados. E, não poderia deixar de agradecer às melhores ICs que alguém poderia conhecer, Camila e Marley.

Um agradecimento especial aos maiores companheiros de laboratório que alguém poderia ter, Tiago e Vânia, que sempre estiveram juntos nas horas boas e nas roubadas, compartilhando as alegrias e as frustrações. Agradeço aos seus conselhos, seus exemplos, sua ajuda, e ao seu companheirismo em todos os momentos de aprendizado (como no congresso da SBBq).

Aos colegas de laboratório que já não estão mais conosco, Marlon, Ilana e Adriana. Um agradecimento especial à Juliana, que muito me ensinou sobre as técnicas do laboratório utilizadas neste trabalho.

À professora Maria Cláudia, pela sua paciência e conhecimentos ensinados, que além de uma “co-orientadora” é uma verdadeira amiga. Às colegas Nicéia e Samira pela experiência profissional e coleguismo.

Não poderia deixar de agradecer aos colegas de turma de mestrado, Álvaro, Luíza, Márcia, Marli, Patrick e Tiago, que me apoiaram em um momento difícil. E aos Professores Marcos Segato, Fátima e Geny, que da mesma forma, me aconselharam a persistir no meu caminho.

Aos colegas de futebol, pelas brincadeiras, brigas e amizade proporcionados. Aos amigos de Florianópolis, que me acolheram como se fosse um amigo de infância.

E, finalmente, um agradecimento aos moradores da “Jumentos House” e a todos os “jumentos” que conviveram dia a dia esta etapa da minha vida, proporcionando alegrias e desesperos (como o caso da pia e das louças). À Dona Corina, que nos manteve muito bem alimentados nestes últimos meses.

Ao Programa de Pós Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina por ter proporcionado a realização desta minha formação profissional, acadêmica e científica.

À CAPEs e ao CNPq, pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO DA LITERATURA	26
2.1. Metabolismo vegetal e a síntese dos metabólitos secundários.....	27
2.2. Ácido gálico: obtenção e antecedentes.....	29
2.3. Derivados n-alkil-ésteres do ácido gálico	33
2.4. Radicais livres e espécies reativas.....	34
2.5. Alvos moleculares das espécies reativas e reações biológicas envolvidas	43
2.6. Antioxidantes.....	54
2.7. O uso de lipossomos como modelos de membranas.....	59
3. OBJETIVOS.....	62
3.1. Objetivos gerais.....	63
3.2. Objetivos específicos	63
4. MATERIAIS E MÉTODOS	65
4.1. Materiais.....	66
4.1.1. Materiais, reagentes e equipamentos	66
4.1.2. Compostos derivados do ácido gálico (galatos)	66
4.2. Metodologia.....	69
4.2.1. Animais.....	69
4.2.2. Avaliação da toxicidade em fatias de fígado de ratos pelo método da redução do MTT	69
4.2.3. Preparo do homogenato de pulmão de ratos	69

4.2.4. Determinação da concentração protéica	70
4.2.5. Ensaio de atividade dos compostos sobre a enzima mieloperoxidase	70
4.2.6. Monitoramento do radical NO [•] pelo método de Griess.....	71
4.2.7. Monitoramento da reatividade com o HOCl.....	71
4.2.7.a. Obtenção do TNB	71
4.2.7.b. Padronização da oxidação do TNB pelo HOCl	72
4.2.7.c. Monitoramento da reatividade com o HOCl	72
4.2.8. Obtenção dos lipossomos	72
4.2.8.a. Obtenção dos lipossomos pela técnica de hidratação do filme lipídico.....	72
4.2.8.b. Obtenção dos lipossomos pelo método de diálise	72
4.2.9. Obtenção do radical ascorbil	73
4.2.10. Síntese de peroxinitrito.....	73
4.2.11. Lipoperoxidação induzida por espécies reativas	74
4.2.12. Determinação do coeficiente de extinção.....	75
4.2.13. Ensaio de incorporação dos galatos nos lipossomos	75
4.2.14. Determinação da concentração dos compostos incorporados nos lipossomos.....	75
4.2.15. Lipoperoxidação dos lipossomos com os compostos incorporados.....	76
4.3. Análise dos resultados	76
 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	 77
5.1. Estudo da capacidade do ácido gálico e dos galatos de inibir a atividade da enzima mieloperoxidase.....	81
5.2. Estudo da capacidade do ácido gálico e dos galatos de seqüestrar ácido hipocloroso pela técnica de oxidação do TNB	86
5.3. Estudo da capacidade do ácido gálico e dos galatos de seqüestrar óxido nítrico	90

5.4. Estudo da capacidade do ácido gálico e dos galatos de protegerem a peroxidação lipídica em lipossomos de fosfatidilcolina	93
5.5. Estudo da influência da lipofilicidade do ácido gálico e dos galatos na intensidade da ação antioxidante <i>in vitro</i>	102
5.6. Estudo da influência incorporação do ácido gálico e de alguns derivados n-alquil-ésteres sintéticos em lipossomos de fosfatidilcolina	108
5.7. Estudo da citotoxicidade do ácido gálico e dos seus n-alquil-ésteres sintéticos em tecido hepático de ratos	112
6. CONCLUSÕES	115
7. PERSPECTIVAS	117
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119
9. ANEXOS	142
9.1. Lista de trabalhos apresentados em eventos	143
9.2. Artigo publicado na revista “Arzneimittel Forschung Drug Research”	147

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do ciclo do metabolismo vegetal secundário	28
Figura 2. Estrutura química do ácido gálico.....	29
Figura 3. Obtenção de moléculas de ácido gálico através da hidrólise ácida de taninos hidrolisáveis.....	30
Figura 4. Exemplo de éster do ácido gálico com atividade fungicida	32
Figura 5. Exemplos de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio	36
Figura 6. Representação esquemática de reações biológicas que produzem espécies reativas de nitrogênio a partir do NO [•]	38
Figura 7. Esquema das reações químicas que podem ocorrer com o peroxinitrito e a formação de seus metabólitos biologicamente ativos.....	39
Figura 8. Sistema ativo de oxigênio e a formação das principais EROs	40
Figura 9. Seqüências reacionais de formação, detoxificação e danos biológicos das principais espécies reativas de interesse biológico	41
Figura 10. Energias de dissociações das ligações C – H para hidrogênios bis-álílicos, álílicos e alquís de cadeias de hidrocarbonetos	46
Figura 11. Esquema da reação de lipoperoxidação de ácidos graxos poli-insaturados.....	48
Figura 12. Esquema da relação entre a ação de sistemas pró-oxidantes e antioxidantes na oxidação de proteínas, e o sistema proteolítico de proteínas oxidadas.....	51
Figura 13. Demonstração esquemática de alguns mecanismos pelos quais o estresse oxidativo pode afetar o DNA e o crescimento celular.....	52
Figura 14. Esquema demonstrando os aspectos multifatoriais dos danos celulares induzidos por espécies reativas	53

Figura 15. Esquema simplificado da ação das SOD mitocondriais e citosólicas.....	54
Figura 16. Reações entre o NO^\bullet e $\text{O}_2^{\bullet-}$ e a ação da Mn-SOD na mitocôndria.....	55
Figura 17. Estrutura química da glutathione e o seu sítio ativo de enxofre	56
Figura 18. Esquema resumido do ciclo redox do sistema glutathione.....	57
Figura 19. Corte transversal de um lipossoma unilamelar.....	60
Figura 20. Demonstração esquemática da síntese de peroxinitrito	73
Figura 21. Reação entre o ácido tiobarbitúrico (TBA) e malonildialdeído (MDA) para formar um aduto de coloração rósea	74
Figura 22. Valores de EC_{50} dos galatos para a reatividade com o radical DPPH.....	79
Figura 23. Valores das IC_{50} dos galatos para proteção da lipoperoxidação em microsomas de fígados de ratos induzida por ascorbil.....	80
Figura 24. Curvas de oxidação da θ -dianisidina pelo produto da atividade da mieloperoxidase em função do tempo na ausência e na presença de crescentes concentrações de ácido gálico.	81
Figura 25. Ação do ácido gálico na atividade da MPO.....	82
Figura 26. Efeito do galato de butila na atividade da MPO.....	83
Figura 27. Valores das $\text{K}_{0,5}$ dos galatos para a inibição da atividade da mieloperoxidase.	84
Figura 28. Curva padrão de oxidação do TNB pelo HOCl.....	86
Figura 29. Proteção da oxidação do TNB pela adição de crescentes concentrações dos compostos 1 (ácido gálico), 8 (galato de heptila), 9 (galato de octila) e 14 (galato de hexadecila) em comparação com o grupo controle (ausência de antioxidante).....	87
Figura 30. Determinação da porcentagem de TNB remanescente no meio de reação.....	88

Figura 31. Valores das IC_{50} do ácido gálico e dos galatos para a inibição da oxidação de 70 μM de TNB por 25 μM de HOCl.....	89
Figura 32. Curva padrão de nitritos	91
Figura 33. Determinação da concentração de nitritos, na ausência (grupo controle) e na presença de até 200 μM de ácido gálico (1) ou dos galatos (2-15), oriundos da reação entre o NO^{\bullet} liberado do NaNPS e o oxigênio	92
Figura 34. Ação dos compostos 1 (ácido gálico), 8 (galato de heptila), 9 (galato de octila) e 15 (galato de octadecila) contra a peroxidação lipídica em lipossomos de fosfatidilcolina induzida por $^{\bullet}Asc$	95
Figura 35. Ação dos compostos 1 (ácido gálico), 8 (galato de heptila), 9 (galato de octila) e 15 (galato de octadecila) contra a peroxidação lipídica em lipossomos de fosfatidilcolina induzida por $ONOO^{-}$	96
Figura 36. Valores das IC_{50} para proteção da lipoperoxidação induzida por $^{\bullet}Asc$ do ácido gálico e dos galatos	97
Figura 37. Valores das IC_{50} para proteção da lipoperoxidação induzida por $ONOO^{-}$ do ácido gálico (1) e dos galatos (2 – 15).....	98
Figura 38. Valores das tangentes das curvas de proteção contra a lipoperoxidação induzida por $^{\bullet}Asc$ e por $ONOO^{-}$ em lipossomos de fosfatidilcolina dos compostos 1, 8, 9, 10 e 15	99
Figura 39. Gráfico da produção de nMol de TBARS por mg de lipídio em lipossomos de fosfatidilcolina pelas espécies reativas $^{\bullet}Asc$ e $ONOO^{-}$	101
Figura 40. Relação $1/EC_{50} \times \log P$. Reatividade do ácido gálico e dos galatos com o DPPH.	103
Figura 41. Relação $1/IC_{50} \times \log P$. Reatividade do ácido gálico e dos galatos com o HOCl.	103
Figura 42. Relação $1/K_{0.5} \times \log P$. Efeito inibitório do ácido gálico e dos galatos sobre a atividade da mieloperoxidase.....	104

Figura 43. Relação $1/IC_{50} \times \text{Log P}$. Ação do ácido gálico e dos galatos contra a proteção da lipoperoxidação em microssomas de fígado de ratos induzida pelo radical ascorbil.	104
Figura 44. Relação $1/IC_{50} \times \text{Log P}$. Ação do ácido gálico e dos galatos contra a proteção da lipoperoxidação em lipossomos de fosfatidilcolina induzida por $\bullet\text{Asc}$	105
Figura 45. Relação $1/IC_{50} \times \text{Log P}$. Ação do ácido gálico e dos galatos contra a lipoperoxidação em lipossomos de fosfatidilcolina induzida pelo ONOO^-	105
Figura 46. Comparação da proteção da lipoperoxidação induzida por $\bullet\text{Asc}$ (A) e por ONOO^- (B) em lipossomos de fosfatidilcolina entre os compostos 1- ácido gálico (31,1 μM), 8- galato de heptila (32,9 μM), 9- galato de octila (28,3 μM) e 15- galato de octadecila (30,3 μM) incorporados e não-incorporados.	110
Figura 47. Comparação da proteção da lipoperoxidação induzida por $\bullet\text{Asc}$ (A) e por ONOO^- (B) em lipossomos de fosfatidilcolina entre o galato de heptila incorporado e não-incorporado.	111
Figura 48. Resultado do ensaio de citotoxicidade dos galatos em tecido hepático de ratos.	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de Log P do ácido gálico e dos galatos	34
Tabela 2. Principais EROs, fontes celulares e sistema antioxidante envolvido	40
Tabela 3. Reações químicas características das espécies reativas	44
Tabela 4. Percentual de ácidos graxos presentes em fosfatidilcolina de soja.....	61
Tabela 5. Valores das $K_{0,5}$ do ácido gálico e dos galatos para a inibição da atividade da mieloperoxidase.	84
Tabela 6. Valores das IC_{50} do ácido gálico e dos galatos para a inibição da oxidação de 70 μ M de TNB por 25 μ M de HOCl.	89
Tabela 7. Valores das IC_{50} s contra a lipoperoxidação induzida por \bullet Asc do ácido gálico e dos galatos	97
Tabela 8. Valores das IC_{50} contra a lipoperoxidação induzida por $ONOO^-$ do ácido gálico e dos galatos	98
Tabela 9. Valores das tangentes dos ângulos das curvas concentração-resposta da proteção da lipoperoxidação induzida por \bullet Asc e por $ONOO^-$ em lipossomos de fosfatidilcolina pelo ácido gálico e galatos.....	100
Tabela 10. Valores dos coeficientes de extinção molar (ϵ) do ácido gálico, do galato de heptila, do galato de octila e do galato de octadecila.	109
Tabela 11. Concentração do ácido gálico, do galato de heptila, do galato de octila e do galato de octadecila incorporada nos lipossomos de fosfatidilcolina pelo método de extrusão e o rendimento.....	109

Tabela 12. Concentrações incorporadas do galato de heptila em lipossomos de fosfatidilcolina pelo método de diálise	111
--	-----

Tabela 13. Valores, em porcentagem, da viabilidade celular de tecido hepático de ratos após a adição de 100 e de 200 μ M do ácido gálico, do galato de etila, do galato de heptila, do galato de octila e do galato de octadecila	1112
--	------

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1.	Reação de síntese do NO^\bullet a partir da L-arginina	35
Equação 2.	Formação do radical dióxido de nitrogênio	37
Equação 3.	Formação de trióxido de dinitrogênio	37
Equação 4.	Formação de tetróxido de dinitrogênio	37
Equação 5.	Formação de ONOO^-	39
Equação 6.	Detoxificação de H_2O_2 pela catalase	42
Equação 7.	Detoxificação de H_2O_2 por peroxidases	42
Equação 8.	Formação de HOCl pela mieloperoxidase	42
Equação 9.	Formação de $^\bullet\text{OH}$ pela reação entre HOCl e $\text{O}_2^{\bullet-}$	42
Equação 10.	Reação de Fenton/Haber-Weiss	42
Equação 11.	Formação de espécie radicalar centrada no carbono durante a lipoperoxidação	47
Equação 12.	Formação de dienos conjugados na lipoperoxidação	47
Equação 13.	Formação de radicais lipoperóxidos na lipoperoxidação	47
Equação 14.	Formação de H_2O_2 pelas SOD	54
Equação 15.	Formação de H_2O_2 pela SOR	55
Equação 16.	Redução de peróxidos pelas GPx com a utilização de GSH	57
Equação 17.	Ciclo redox da glutatona	58
Equação 18.	Reação entre o TNB e o HOCl	86

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

•Asc	— radical ascorbil
CAT	— catalase
DPPH	— 2,2-diphenil-1-picrilhidrazil
DTNB	— ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico
eNOS	— óxido nítrico sintase endotelial
ERNs	— espécies reativas de oxigênio
EROS	— espécies reativas de oxigênio
GPx	— glutational peroxidase
GR	— glutational redutase
GR	— glutational redutase
GSH	— glutational reduzida
GSNO	— S-nitroso glutational
GSSG	— glutational oxidada
GST	— glutational trasferase
HO ₂ •	— radical hidroperoxil
HOCl	— ácido hipocloroso
HONOO	— ácido peroxinitroso
iNOS	— óxido nítrico sintase induzida
LDL	— lipoproteína de baixa densidade
Log P	— logaritmo do coeficiente de partição
LUVs	— vesículas grandes unilamelares
MLVs	— vesículas grandes multilamelares
MPO	— mieloperoxidase
MTT	— brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

N_2O_2	— dióxido de dinitrogênio
N_2O_3	— trióxido de dinitrogênio
N_2O_4	— tetróxido de dinitrogênio
NADP^+	— nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada)
NADPH	— nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NaNPS	— nitroprussiato de sódio
nNOS	— óxido nítrico sintase neuronal
NO^\bullet	— óxido nítrico
NO_2^-	— nitrito
NO_2^\bullet	— radical dióxido de nitrogênio
$^\bullet\text{NO}_2$	— radical nitrito
NO_3^-	— nitrato
NOS	— óxido nítrico sintase
$\text{O}_2^{\bullet-}$	— radical ânion superóxido
$^\bullet\text{OH}$	— radical hidroxil
ONOO^-	— peroxinitrito
ONOOCO_2^-	— peroxicarbamato nitroso
PUFAs	— ácido graxos poliinsaturados
RO^\bullet	— radical alcóxil
RO_2^\bullet	— radical peróxil
SOD	— superóxido dismutase
SUVs	— vesículas pequenas unilamelares
TBARS	— espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNB	— ácido 5-tio-2-nitrobenzóico
XOD	— xantina oxidase

RESUMO

Derivados n-alquil-ésteres do ácido gálico (galatos) têm ampla aplicação como antioxidante na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica. O ácido gálico também é empregado na indústria de tinturas para o desenvolvimento de cores. Em estudos recentes, foram demonstradas atividades biológicas de derivados do ácido gálico, como antiviral, antibacteriana, antitumoral e antioxidante. A porção ácida do ácido gálico foi esterificada com álcoois alifáticos, e cadeias alquílicas ($C_1 - C_{18}$) foram introduzidas na molécula. Estes derivados n-alquil-ésteres diferem entre si apenas no tamanho da cadeia alifática lateral, o que influencia nas respectivas lipofilicidades, definidas pelo Log P. Neste trabalho, foi realizado um estudo comparativo entre o tamanho da cadeia alifática lateral (e o Log P) dos galatos e a atividade antioxidante *in vitro*, bem como as respectivas toxicidades em tecido hepático de ratos. Os valores de Log P variaram entre 0,8918 e 7,6791. As IC_{50} variaram entre 8,46 e 41,93 μM para inibição da atividade da mieloperoxidase (MPO); 3,0 e 29,6 μM para a reatividade com HOCl; 21,7 e 140,0 μM para proteção da lipoperoxidação induzida por ascorbil ($^{\bullet}Asc$); e 117,2 e 282,8 μM para proteção da lipoperoxidação induzida por peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$). Nenhum dos compostos apresentou reatividade com óxido nítrico nem apresentaram toxicidade em tecido hepático de ratos. O tamanho da cadeia alifática influenciou na atividade da MPO, pois quanto menor o número de C maior foi a inibição da enzima. Por outro lado, os compostos com Log P próximos a 4 (C_6 a C_{10}) apresentaram maior proteção contra a lipoperoxidação induzida tanto por $^{\bullet}Asc$ quanto por $ONOO^{\bullet}$. O galato mais ativo contra a lipoperoxidação (galato de octila) foi incorporado em lipossomos de fosfatidilcolina e aumentou a intensidade do efeito antioxidante. Em resumo, os compostos testados apresentaram potencial antioxidante, ressaltando-se o efeito contra a atividade da mieloperoxidase, uma enzima com papel importante nos processos inflamatórios. Adicionalmente, pode-se sugerir que os compostos também podem atuar como seqüestradores de espécies reativas além de interagir com as membranas lipídicas impedindo a propagação do processo de oxidação.

ABSTRACT

Evaluation of antioxidant potential of gallic acid n-alkyl esters.

Derivatives n-alkyl-esters of gallic acid (gallates) have broad application as antioxidant in food, cosmetic and pharmaceutical industry. The gallic acid also is used in dye industry in colors development. In recent studies, were demonstrated several biological activities of gallic acid derivatives, such as antiviral, antibacteriana, antitumoral, antifungal and antioxidant. The acid function of gallic acid was esterified with aliphatic alcohols, in which alkyl chain ($C_1 - C_{18}$) was attached at the molecule. The compounds were different only at the size of their aliphatic side chain having influence on their lipophilicity, that was evaluated through their respective Log P. In these work, it was carried out a comparative study between the size side chain aliphatic (and the Log P) of the gallates and the antioxidant activity *in vitro*, as well as their toxicity in rat hepatic tissue. The Log P values varied between 0,8918 and 7,6791. The IC_{50} for myeloperoxidase (MPO) activity inhibition varied from 8,46 to 41,93 μM ; 3,0 to 29,6 μM for reactivity with HOCl; 21,7 to 140, μM for lipoperoxidation protection induced by ascorbyl ($^{\bullet}Asc$); and 117,2 to 282,8 μM for lipoperoxidation protection induced by peroxynitrite ($ONOO^-$). Anyone of the compounds showed reactivity with neither nitric oxide nor toxicity for rat hepatic tissue. The size of aliphatic side chain affected on the MPO activity, since the smaller the lateral aliphatic chain higher the inhibition of the enzyme. On the other hand, the compounds with Log P near 4 (C_6 to C_{10}) showed higher protection against lipoperoxidation induced by both $^{\bullet}Asc$ or $ONOO^-$. The more active compound against the lipoperoxidation (octyl gallate) was incorporated into liposomes and the intensity of antioxidant effect increased. Concluding, the analyzed compounds showed antioxidant potential in the interval mentioned concentration standing out the effect against MPO activity, an enzyme with important role in inflammatory process. Additionally, they were able to scavenge reactive species and to interact with the lipid membranes avoiding the propagation of the oxidation process.

1. Introdução

Atualmente, há uma necessidade crescente do desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para as mais diversas especialidades clínicas, como microbiologia, parasitologia, virologia, oncologia, entre outras. O aumento da não-eficácia de muitos medicamentos utilizados corriqueiramente na clínica, como uma preocupação mundial na área de saúde, tem sido discutido em encontros científicos de profissionais e pesquisadores.

A malária, por exemplo, é endêmica em cerca de 90 países no mundo e é responsável pela morte de cerca de 1 a 2 milhões de pessoas anualmente. Está havendo um aumento na sua incidência e letalidade, devido à propagação da sua resistência aos tratamentos padrões com agentes antimaláricos (TAMEZ *et al.*, 2005). Outra situação preocupante é o aumento de cepas bacterianas resistentes a múltiplos fármacos, restringindo o arsenal terapêutico antibacteriano empregado na clínica aos de última geração (LOMBARDI *et al.*, 2002; PELLEGRINO *et al.*, 2002; PAGANI *et al.*, 2004). A prevalência de *Mycobacterium tuberculosis* resistente aos tratamentos padrões também tem se tornado um problema de saúde pública. Devido à longa duração, o tratamento torna-se bastante oneroso, além da ocorrência de muitos insucessos e a disseminação do agente infeccioso (FERDINAND *et al.*, 2003; MUKHERJEE *et al.*, 2004). Adicionalmente, pode-se mencionar o crescente número de pacientes HIV positivos refratários aos tratamentos (TEMALET *et al.*, 2000; TANG; PILLAY, 2004) e de pacientes leucêmicos que não respondem à quimioterapia (DAENEN *et al.*, 2004; TAUCHI & OHYASHIKI, 2004).

Há algumas décadas as espécies reativas têm sido associadas como causa ou como agravante de muitas doenças. Particularmente, as doenças autoimunes e neurodegenerativas, em que foi observada uma implicação direta de espécies reativas, também necessitam de fármacos mais eficazes para o tratamento. Na doença inflamatória intestinal e na artrite reumatóide, por exemplo, ocorre uma intensa formação de espécies reativas, oriundas do metabolismo de neutrófilos ativados, responsável pela inflamação característica (THOMAS; KALYANARAMAN, 1997). Entre as doenças neurodegenerativas, o mal de Parkinson e a doença de Alzheimer's são as que apresentam um maior impacto

na vida das pessoas, e a sua patogênese está correlacionada com a formação de espécies reativas no sistema nervoso central, além de fatores etiológicos e genéticos (GIASSON *et al.*, 2002).

Até o século XIX, o tratamento das enfermidades baseava-se principalmente em plantas e extratos vegetais. Devido a estes conhecimentos populares, muitos princípios ativos foram isolados e empregados na clínica, como por exemplo, a quinina, a digitoxina, os alcalóides da vinca, o taxol, a morfina, entre outros. A busca de moléculas de origem natural é uma forma importante de encontrar-se princípios biologicamente ativos, com grande potencial de ser explorado. Entretanto, esta análise de princípios ativos é bastante complexa e demorada, visto que há uma grande quantidade de metabólitos secundários além dos que estão presentes em pequenas proporções e que apresentam efeitos biológicos de interesse (CECHINEL FILHO; YUNES, 2001).

A síntese de análogos a partir de princípios ativos isolados naturalmente tem contribuído para a obtenção de novos agentes terapêuticos. Ao isolar-se uma substância química biologicamente ativa pode-se promover modificações moleculares em sua estrutura com a finalidade de otimizar tal atividade, incorporando-se novos grupamentos, ou até mesmo, simplificando-se a molécula. Como conseqüência, estas ações podem modificar a potência, a duração e, também, a natureza do efeito farmacológico. A introdução de substituintes, por exemplo, pode alterar diversas propriedades físico-químicas de uma molécula como hidrofobicidade, conformação estrutural e conseqüentemente as suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas; além de elucidar a importância desses substituintes na sua atividade biológica (CECHINEL FILHO; YUNES, 2001). Deste modo, pretendemos demonstrar neste trabalho a influência da introdução de diferentes substituintes lipofílicos na molécula do ácido gálico na sua atividade antioxidante *in vitro*.

2. Revisão da Literatura

2.1. Metabolismo vegetal e a síntese dos metabólitos secundários

A partir do metabolismo dos açúcares, as células vegetais são capazes de sintetizar energia, principalmente na forma de ATP, poder redutor (NADPH) e macromoléculas como aminoácidos, carboidratos, gorduras e ácidos nucleicos, essenciais para a sobrevivência da planta. Este conjunto de reações que produzem substâncias indispensáveis à vida das células vegetais é denominado de metabolismo primário (TORSSELL, 1997).

Estes metabólitos primários servem de substratos para a síntese de inúmeras outras substâncias químicas, através de um processo denominado de metabolismo secundário. O metabolismo secundário tem por objetivo produzir substâncias que garantam vantagens para a sobrevivência da planta e perpetuação da espécie, como uma forma de adaptação ao meio em que vivem. Diferentemente do metabolismo primário, em que as rotas metabólicas são similares na maioria das células e organismos, o metabolismo secundário é mais particularizado, podendo diferir-se até mesmo entre indivíduos da mesma espécie de acordo com as condições de crescimento e desenvolvimento (DIXON, 2001; VERPOORTE; MEMELINK, 2002).

A maioria das classes desses metabólitos secundários deriva do metabolismo da glicose, por diferentes reações bioquímicas, via dois principais intermediários, o ácido chiquímico e o acetato. Desta forma, formam-se os metabólitos secundários derivados do ácido chiquímico, do qual origina-se a maioria das substâncias aromáticas, e do acetato, além dos derivados oriundos de condensações entre intermediários de ambas as rotas (Figura 1). Além disso, estes metabólitos podem ser denominados, segundo a forma em que se encontram nos vegetais, em agliconas, quando encontrados na forma livre, ou em heterosídeos, quando ligados a uma molécula de açúcar (SIMÕES *et al.*, 2003).

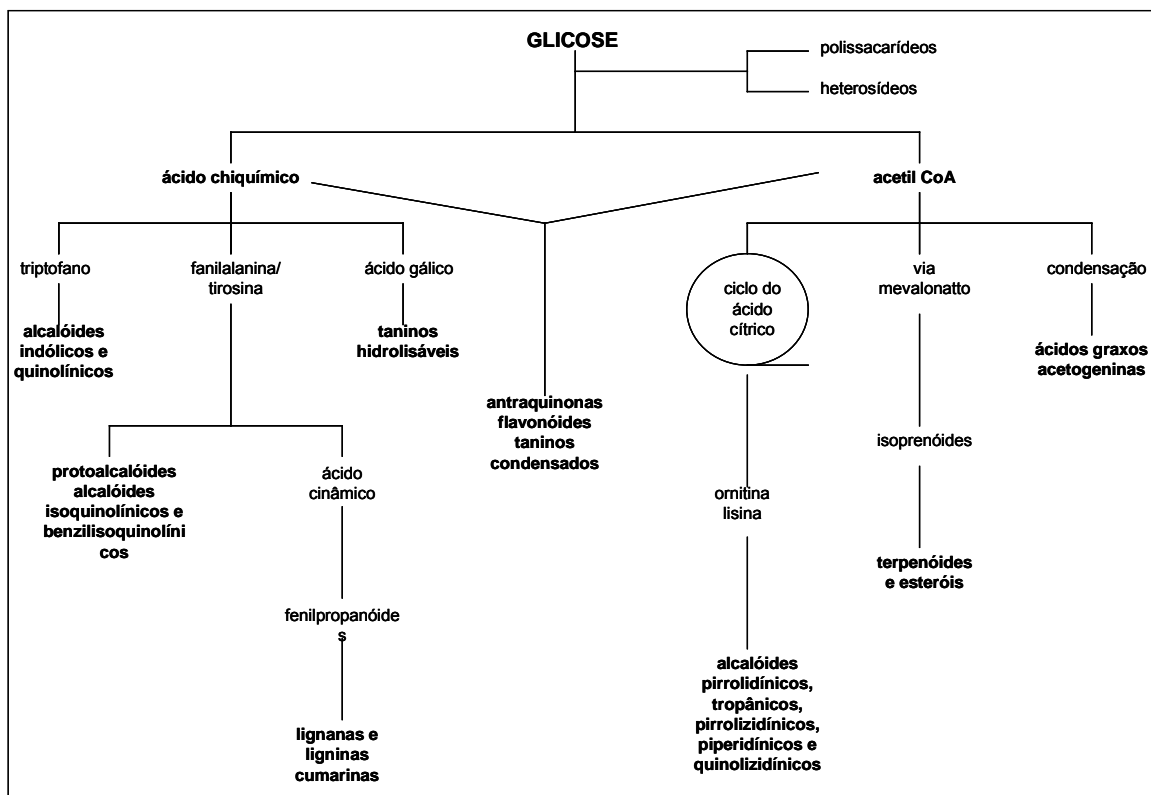


Figura 1: Representação esquemática do ciclo do metabolismo vegetal secundário (adaptado de SIMÕES *et al.*, 2003).

Devido à diversidade de substâncias possíveis de serem obtidas, o metabolismo secundário de plantas é uma fonte de aditivos farmacêuticos e alimentícios, além de serem utilizados na química fina como protótipos para a síntese de derivados. Alguns trabalhos são focados para melhorar a produção dessas substâncias, como a manipulação de culturas de células vegetais para aumentar a produtividade de um metabólito alvo, lançando mão de diversos recursos como a utilização de processos químicos e fisiológicos que alteraram a performance das biorreações celulares, além do estudo das vias de sinalização celular para a síntese destas substâncias, de fatores de transcrição e da clonagem de genes biossintéticos, entre outros (ZHAO *et al.*, 2005).

2.2. Ácido gálico: obtenção e antecedentes

O ácido gálico (Figura 2), que consiste em uma estrutura fenólica tri-hidroxilada, é um intermediário do metabolismo vegetal secundário, e é freqüentemente um componente de taninos hidrolisáveis em plantas (GRUNDHÖFER *et al.*, 2001).

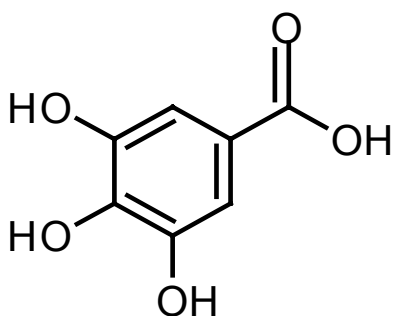


Figura 2: Estrutura química do ácido gálico.

Têm sido propostas três rotas biossintéticas do ácido gálico derivadas do chiquimato (GROSS apud SIMÕES *et al.*, 2003):

- a) via L-fenilalanina \Rightarrow ácido 3,4,5-tri-hidróxi-cinâmico;
- b) via L-fenilalanina \Rightarrow protocatenuato;
- c) via aromatização direta do ácido 3-des-hidrochiquímico.

Torssell (1997) descreve que a via fenilalanina \rightarrow ácido cinâmico \rightarrow ácido p-hidróxi cinâmico \rightarrow ácido cafeico \rightarrow ácido 3,4,5-trihidroxicinâmico \rightarrow ácido gálico é a preferencial para a síntese de ácido gálico em *Rhus typhina*.

Plantas ricas em taninos são utilizadas para a produção de tinturas e curtimento de couro, além da sua versatilidade terapêutica na medicina popular no tratamento de diarreia, hipertensão, reumatismo e problemas renais, entre outros (SIMÕES *et al.*, 2000; NIEMETZ; GROSS, 2005). O potencial antioxidante,

antiviral e antitumoral, além de outras propriedades biológicas de interesse medicinal, têm sido pesquisados por laboratórios em todo mundo. Tanimura *et al.* (2005), citam a capacidade de taninos hidrolisáveis em inibir a ação invasiva de células tumorais, via inibição das matrizes metaloproteinases 2 e 9, que estão associadas ao aumento do potencial metastático em muitas células tumorais, via degradação do colágeno. Outros autores, como Cheng *et al.* (2002), citam a atividade antiviral da casuarinina, um tanino hidrolisável isolado da *Terminalia arjuna* Linn., contra o vírus herpes simplex tipo 2. Yang *et al.* (2000), citam a ação de indução de apoptose em células leucêmicas por taninos hidrolisáveis da *Eugenia lambos* L., além da capacidade de galotaninos seqüestrarem espécies reativas como superóxido e óxido nítrico descrita por Nakagawa & Yokozawa (2002).

O ácido gálico, por sua vez, pode ser obtido através da hidrólise ácida de taninos hidrolisáveis (Figura 3), e, por ser um dos principais componentes destas moléculas, as suas propriedades biológicas e de seus análogos têm sido amplamente investigada. Não se pode afirmar ao certo quem descreveu primeiramente o processo de obtenção do ácido gálico através da hidrólise de taninos, embora sejam encontrados registros desde 1910.

Em sua função ácida, o ácido m,m',p-3,4,5-tri-hidróxi benzóico (nome químico do ácido gálico) permite a introdução dos mais variados substituintes, possibilitando, desta forma, a obtenção de inúmeros análogos ésteres com os mais distintos efeitos farmacológicos.

Em meados do século XVIII, pesquisadores como George Sampsom (1849) e John Lyell (1849) já relatavam a utilização do ácido gálico para o tratamento de microalbuminúria. Em 1910, Ehrmann cita que o ácido gálico forma um complexo de coloração vermelha com m-hidroxidifenilamina, o que culminou na sua utilização na indústria de tinturas.

Em 1945, Bucher descreveu a capacidade do ácido gálico em proteger a rancificação do óleo de salmão. Kring *et al* (1950), descreveram a habilidade de pequenos ésteres do ácido gálico em prevenir a rancificação de diversas gorduras, semelhante ao que Bucher descreveu anteriormente em 1945. Thompson *et al*

(1953), relataram sobre a atividade antimalárica do ácido gálico e de outras estruturas químicas similares. Mahadevam & Reddy (1968), demonstraram a atividade antifúngica do ácido gálico, do catecol, do floriglucinol e do floretin. No mesmo ano, Isoyama e colaboradores demonstraram a atividade antibacteriana de derivados sintéticos do ácido gálico sobre *Bacillus subtilis*, *Staphilococcus aureus* e *Escherichia coli*. Em 1970, Frolov e Mishenkova, descreveram a atividade anti-influeza do ácido gálico *in vivo* e *in vitro*, demonstrando a redução da mortalidade de macacos expostos ao vírus por diminuir o desenvolvimento do quadro de pneumonia.

A partir da década de 70, com a introdução de novos métodos de extração e isolamento (MGEBRISHVILI, 1977; MOLL *et al.*, 1978), a obtenção do ácido gálico a partir de plantas (DA SILVA, 1970; GUVEN *et al.*, 1974) e de microorganismos (KORTH, 1973) passou a ser mais relatada, bem como a síntese química de seus derivados (FORGO; BUCHI, 1970; TAKAHASHI *et al.*, 1977). Na mesma década, estudos de atividade biológica de derivados do ácido gálico foram intensificados: Matrka *et al.* (1979), relataram a ação inibitória do efeito carcinogênico de nitrosaminas, devido à presença de substituintes hidróxi no anel; Tripathi e Dixit (1977), descreveram a atividade fungitóxica; e, no mesmo ano, Werner e colaboradores relataram a atividade fungicida de ésteres sintéticos derivados do ácido gálico em maçãs infestadas por *Fusicladium dentriticum*.

Os estudos sobre a extração, isolamento do ácido gálico e a síntese de derivados continuaram na década de 80 e ainda vem sendo descritos. A evolução das tecnologias utilizadas nesta área, como a implementação da cromatografia líquida de alta eficiência, da cromatografia gasosa, da ressonância magnética nuclear e da espectrometria de massas, entre outras, possibilitou um melhor desempenho na obtenção e caracterização destas moléculas. A partir destes avanços tecnológicos pôde-se observar um crescente número de publicações relatando a obtenção do ácido gálico em diferentes espécies de vegetais, bem como a obtenção de derivados por diversos processos químicos.

Apesar de o ácido gálico e seus mais diversos derivados terem sido bastante estudados, não foi encontrada na literatura uma abordagem sistemática mostrando a influência dos substituintes do anel fenólico e dos grupos esterificados em sua função ácida nas atividades biológicas. Isto ocorre porque a maioria destes estudos relata apenas a ausência ou a presença da atividade biológica em uma determinada molécula química, não abordando uma dinâmica racional de substituição e esterificação do ácido gálico na atividade biológica.

2.3. Derivados n-alkil-ésteres do Ácido gálico

Alterações químicas na molécula do ácido gálico podem modificar as suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, pois alteram a solubilidade, o coeficiente de partição (Log P) e o grau de ionização (pKa). Conseqüentemente, estas alterações afetam o efeito biológico, pois modificam a afinidade por alvos celulares e a difusão através das membranas lipídicas (ANCEREWIKZ *et al.*, 1998; MEKAPATI *et al.*, 2005). Leal (2004), esterificou a função ácida do ácido gálico com álcoois alifáticos e obteve 14 derivados n-alkil ésteres, os quais diferem-se apenas no número de carbonos da cadeia alifática lateral e isto lhes atribui diferentes características físico-químicas, principalmente de lipofilicidade, avaliada pelo valor de Log P (Tabela 1).

O Log P é uma das principais propriedades físico-químicas de uma substância, pois expressa a lipofilicidade relativa. Este parâmetro fornece uma medida do balanço de lipofilicidade-hidrofiliicidade através da distribuição de uma substância entre dois líquidos imiscíveis, uma fase orgânica e outra aquosa. Geralmente, para a determinação do Log P, utiliza-se o n-octanol como fase orgânica porque as suas propriedades assemelham-se às de uma bicamada lipídica de membrana. Assim, após a substância em questão entrar em equilíbrio com as duas fases, o coeficiente de partição pode ser obtido pelo logaritmo da

divisão da concentração da respectiva substância presente na fase orgânica pela sua quantidade presente na fase aquosa (BENNET *et al.*, 2004; LEAL, 2004).

Tabela 1: Valores de Log P do ácido gálico e dos galatos.

Composto	Log P	Composto	Log P
Ácido Gálico	0.89	Galato de octila	3.72
Galato de metila	0.92	Galato de decila	4.51
Galato de etila	1.27	Galato de undecila	4.90
Galato de propila	1.73	Galato de dodecila	5.30
Galato de butila	2.13	Galato de tetradecila	6.09
Galato de pentila	2.53	Galato de hexadecila	6.89
Galato de hexila	2.92	Galato de octadecila	7.68
Galato de heptila	3.32		

Assim, quanto maior o valor de Log P, maior é a lipossolubilidade de um determinado composto químico e, conseqüentemente, maior é a sua interação com biomembranas. Para exemplificar:

- Log P = 1, corresponde 10:1 Fase orgânica / Fase aquosa;
- Log P = 0, corresponde 1:1 Fase orgânica / Fase aquosa;
- Log P = -1, corresponde 1:10 Fase orgânica / Fase aquosa.

Através de seu trabalho, Leal (2004) observou que os compostos com Log P entre 2,9 e 4,5 apresentaram uma atividade antifúngica *in vitro* mais efetiva, demonstrando a influência da hidrofobicidade nesta atividade biológica. Entretanto, foi possível observar que os compostos mais ativos não são os mais lipofílicos, demonstrando que há uma faixa ideal de Log P para um efeito fungicida mais efetivo.

2.4. Radicais livres e espécies reativas

Segundo o princípio de Linus Pauling, os elétrons de um átomo são distribuídos em camadas eletrônicas que possuem no máximo 4 sub-níveis energéticos (s, p, d e f). Cada sub-nível possui respectivamente 1, 3, 5 e 7 orbitais ocupados por no máximo dois elétrons com spins contrários (+1/2 e -1/2). Deste modo, a distribuição eletrônica de um determinado átomo segue a seqüência de suas camadas eletrônicas preenchendo os orbitais de seus sub-níveis energéticos.

Nos organismos superiores como os mamíferos, durante o seu metabolismo, há a formação de espécies químicas biologicamente reativas, denominadas de espécies reativas. Estas moléculas são quimicamente instáveis e altamente reativas, promovendo reações de redução e oxidação nas demais moléculas orgânicas, danificando as suas funções fisiológicas. Assim, as espécies reativas estabilizam-se ao reagirem com os átomos das demais macromoléculas orgânicas, promovendo alterações nas suas ligações químicas.

De acordo com a distribuição eletrônica, estas espécies reativas podem ser classificadas em radicalares, quando possuem um ou mais elétrons não-emparelhados em sua última camada eletrônica, e não radicalares (KEHRER, 1993; THOMAS; KALYANARAMAN, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000). Além disso, estas espécies reativas podem ser diferenciadas em Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e em espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs), de acordo com as moléculas a partir das quais foram originadas. Exemplos de tais moléculas estão apresentados na Figura 5.

As espécies reativas de nitrogênio possuem, biologicamente, o óxido nítrico (NO^\bullet) como fonte primária. O NO^\bullet , também conhecido como monóxido de nitrogênio, é sintetizado no organismo pelas enzimas óxido nítrico sintases (NOS), através da oxidação da L-arginina pelo O_2 na presença de cofatores enzimáticos (Equação 1) (MONCADA *et al*, 1991; ESTÉVEZ; JORDÁN, 2002; LEONG *et al*, 2002). São três as principais isoformas de NOS, neuronal (nNOS), endotelial

(eNOS) e induzida (iNOS), com diferentes expressões e atividades (MONCADA *et al.*, 1991, 2000; KISS, 2000; ESTÉVEZ; JORDÁN, 2002; LEONG *et al.*, 2002).



EROs

Radicalares

Superóxido, $O_2^{\bullet-}$

Hidroxil, $\bullet OH$

Peroxil, RO_2^{\bullet}

Alcoxil, RO^{\bullet}

Hidroperoxil, HO_2^{\bullet}

Não radicalares

Peróxido de Hidrogênio, H_2O_2

Ácido hipocloroso, $HOCl$

Ácido hipobromoso ($HOBr$)

Ozônio, O_3

ERNs

Radicalares

Monóxido de Nitrogênio, NO^{\bullet}

Dióxido de Nitrogênio, NO_2^{\bullet}

Não radicalares

Ácido Nitroso, HNO_2

Trióxido de dinitrogênio, N_2O_3

Dióxido de dinitrogênio, N_2O_2

Íon nitrônio, NO_2^+

Ânion Nitroxil, NO^-

Tetróxido de Dinitrogênio, N_2O_4

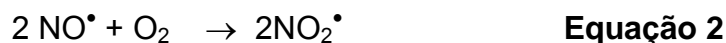
Peroxinitrito, $ONOO^-$

Ácido Peroxinitroso, $ONOOH$

Cloreto de Nitrila, NO_2Cl

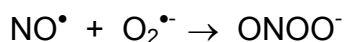
Figura 5: Exemplos de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (THOMAS; KALIANARAMAN, 1997).

Em concentrações fisiológicas, o NO[•] atua principalmente como mensageiro celular estimulando guanilato ciclase e proteínas quinases, bem como relaxante da musculatura lisa de vasos sanguíneos (LEPOIVRE *et al.*, 1994; ANDOH *et al.*, 2002). Além disso, o NO[•] exerce ação na regulação endócrina e imunológica, na neuromodulação, influenciando inclusive na formação da memória e na neurotransmissão, entre outras (YEO, 2002; COSTA *et al.*, 2003). O NO[•] formado pode ser neutralizado ao reagir com glutathione, resultando na formação do aducto S-nitroso-glutathione (GSNO), além de reagir com O₂ formando nitritos (NO₂⁻) e nitratos (NO₃⁻) (NORDBERG; ARNÉR, 2001; ESPEY *et al.*, 2002). Durante este segundo processo, podem ocorrer a produção de ERNs como radical dióxido de nitrogênio (NO₂[•]), trióxido de dinitrogênio (N₂O₃) e tetróxido de dinitrogênio (N₂O₄) (Equações 2-4) (MONCADA *et al.*, 1997; ESPEY *et al.*, 2002).



Entretanto, o NO[•] pode interagir com centros metálicos em proteínas, como os de ferro (Fe⁺⁺) e os de cobre (Cu⁺⁺), ou com outros radicais livres, resultando na formação de ERNs (Figura 6) (PATEL *et al.*, 1999; ESPEY *et al.*, 2002).

A reação entre o NO^\bullet com o radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) pode levar à formação do ânion peroxinitrito (ONOO^-) (Equação 5) (RADI *et al.*, 2001; RADI *et al.*, 2002). O ONOO^- formado pode reagir rapidamente com CO_2 , formando o peroxicarboxilato nitroso ($\text{ONO}_2\text{CO}_2^-$), ou ser protonado, formando o ácido peroxinitroso (HONOO), que por homólise pode formar o radical hidroxil ($^\bullet\text{OH}$) e o radical nitrito ($^\bullet\text{NO}_2$) (Figura 7) (RADI *et al.*, 2001; ESPEY *et al.*, 2002). O ONOO^- , por ação direta ou de seus produtos, pode provocar a peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados, e está envolvido no processo aterosclerótico por oxidar proteínas de baixa densidade (LDL); na liberação de Cu^{++} por destruir a ceruloplasmina; e na oxidação de proteínas por atacar principalmente resíduos de tirosina (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000; RADI *et al.*, 2001).



Equação 5

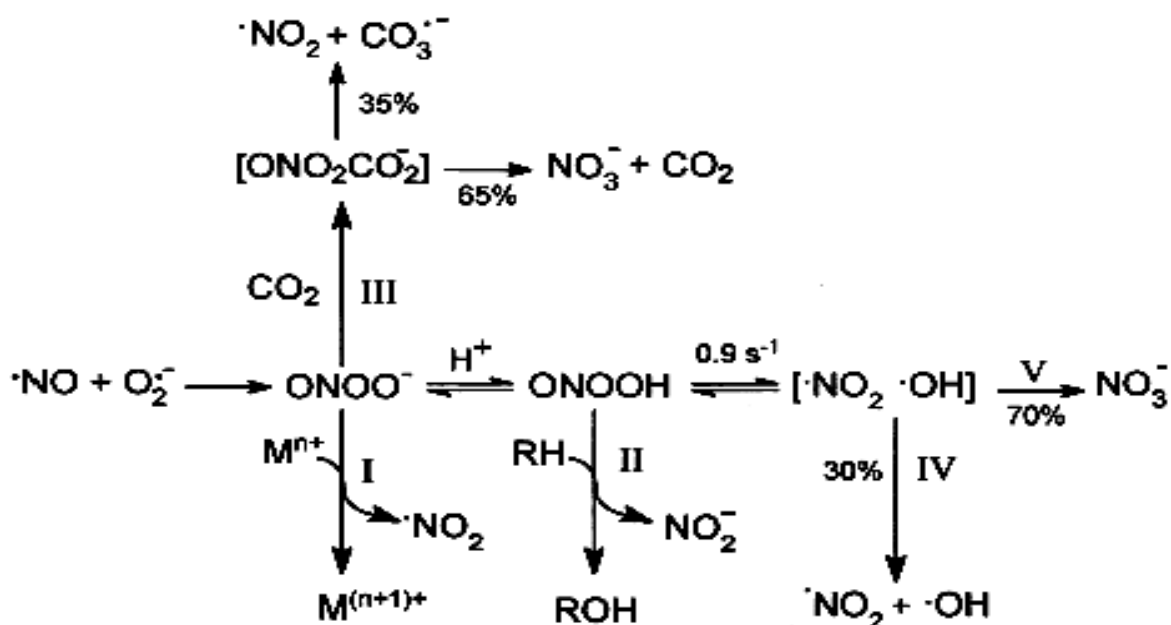


Fig 7: Esquema das reações químicas que podem ocorrer com o peroxinitrito e a formação de seus metabólitos biologicamente ativos (RADI *et al.*, 2001).

As EROs podem ser geradas a partir do metabolismo de aminos biológicas, prostaglandinas, purinas, esteróides, aminoácidos, carnitinas, e enzimas como a xantina oxidase (XOD) e mieloperoxidase (MPO). Além disso, podem ser produzidas a partir da auto-oxidação endógena de moléculas como flavinas, catecolaminas, hidroquinonas e hemoglobinas, bem como da ação de redutases de flavoproteínas e de citocromos P₄₅₀, entre outros (KLEINVELD *et al.*, 1989; FLESCHIN *et al*, 2000).

As EROs, assim como as ERNs, também reagem com outras biomoléculas degradando-as. Através do sistema ativo de oxigênio, pode-se resumir as etapas de formação das principais EROs (Figura 8). Todavia, cada ERO possui um sistema preferencial de formação, com diferentes fontes celulares, sistema antioxidante envolvido e produtos formados (Tabela 2) (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

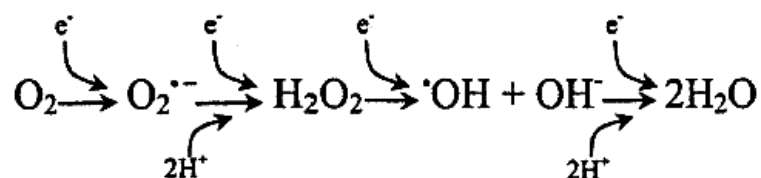


Figura 8: Sistema ativo de oxigênio e a formação das principais EROs (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

Tabela 2: Principais EROs, fontes celulares e sistema antioxidante envolvido (NORDBERG; ARNÉR, 2001; KLAUNING; KAMENDULIS, 2004).

EROS	Principais fontes	Principal sistema enzimático de defesa	Produto(s)
Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	Cadeia respiratória	Superóxido dismutase (SOD)	$H_2O_2 + O_2$
	Fagócitos ativados	Superóxido redutase (SOR – em algumas bactérias)	H_2O_2
	Xantina oxidase Flavoenzimas		
Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)	A partir do $O_2^{\bullet-}$ via SOD	Glutationa Peroxidase (GPx)	$H_2O + GSSG$
	NADPH-oxidase	Catalases (CAT)	$H_2O + O_2$
	Glicose oxidase	Peroxiredoxinas (Prx)	H_2O
	Xantina oxidase		
Hidroxil ($^{\bullet}OH$)	A partir do $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 via metais de transição (Fe^{++} ou Cu^{++})		

O $O_2^{\bullet-}$ pode ser formado pela reação de oxidação da hipoxantina à xantina, catalisada pela enzima XOD (VIVOT *et al*, 2001). Além disso, o $O_2^{\bullet-}$ é formado espontaneamente na cadeia respiratória da membrana mitocondrial e desempenha um papel central numa complexa seqüência de formação de outras espécies reativas. O $O_2^{\bullet-}$ pode reagir com o NO^{\bullet} (Equação 5) formando $ONOO^-$; e ou, por ação da enzima superóxido dismutase (SOD), pode formar peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um outro intermediário reativo (Figura 9) (REITER, 1998; NORDBERG; ARNÉR, 2001).

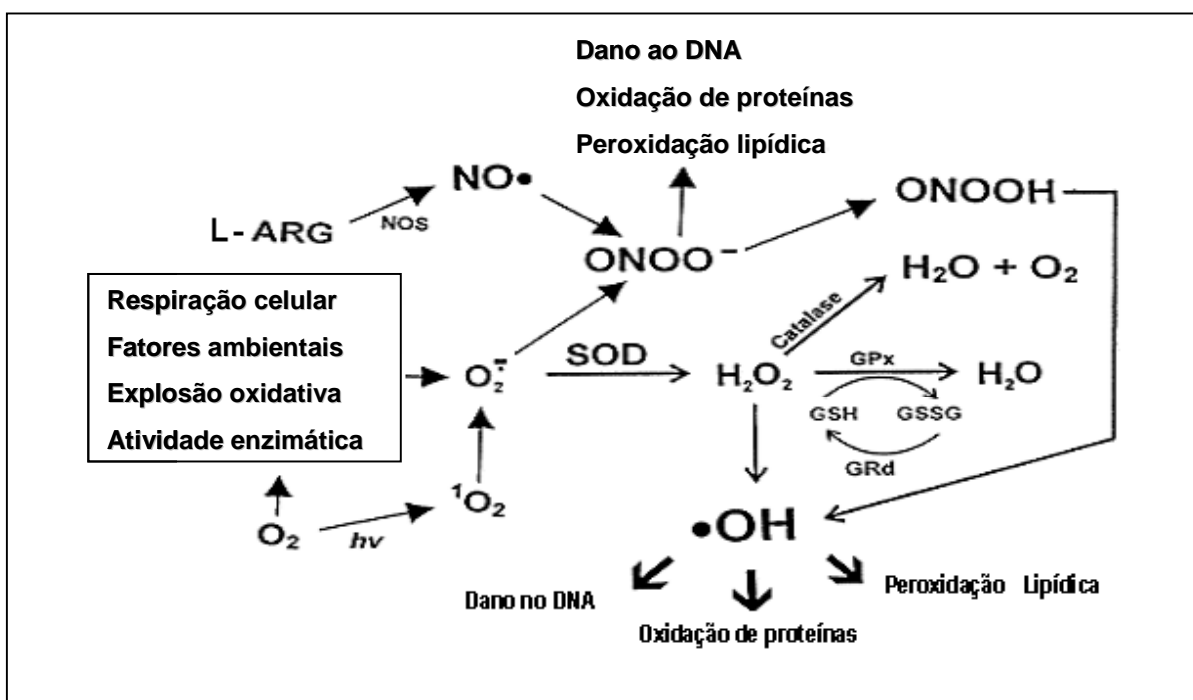
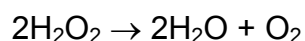
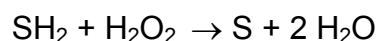


Figura 9: Seqüências reacionais de formação, detoxificação e danos biológicos das principais espécies reativas de interesse biológico (REITER, 1998).

O H_2O_2 é uma importante espécie reativa devido a sua habilidade em penetrar nas membranas biológicas e por desempenhar um papel de intermediário para a formação de outras EROs (conforme demonstrado na Figura 8 e 9). Além da SOD, a urato oxidase e a monoamino oxidase também podem gerar H_2O_2 . A inativação das moléculas de H_2O_2 pode ser realizada pela ação da catalase (CAT), que as transforma em moléculas de O_2 e H_2O (Equação 6), e de peroxidases (Pr) (Equação 7) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000; NORDBERG, ARNÉR, 2001).



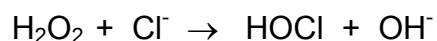
Equação 6



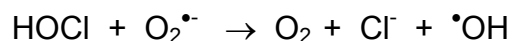
Equação 7

A MPO, presente nos fagócitos, tem a habilidade de transformar H_2O_2 e Cl^- em ácido hipocloroso (HOCl) (Equação 8). O HOCl , um poderoso oxidante envolvido no processo de fagocitose, tem as proteínas como o seu principal alvo

biológico. Este ácido promove alterações em sítios específicos de aminoácidos, promovendo fragmentações e dimerizações de proteínas, além de reagir também com aminogrupos formando derivados semi-estáveis cloroaminados e formar isômeros α,β -clorohidrininas ao reagir com ligações duplas de lipídios insaturados (WINTERBOURN, 1985; WINTERBOURN *et al.*, 1992; ZAVODNICK *et al.*, 2002). O HOCl age diretamente oxidando as biomoléculas, bem como por ação do gás cloro (Cl_2) formado pela sua decomposição. Além disso, pode reagir com $\text{O}_2^{\bullet-}$ e originar $\bullet\text{OH}$ (Equação 9).

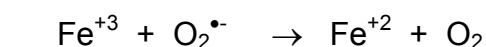


Equação 8

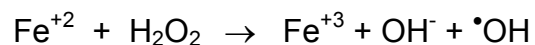


Equação 9

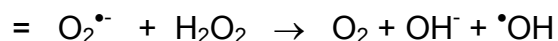
O $\bullet\text{OH}$ é a mais reativa espécie de oxigênio, e reage rapidamente com açúcares, aminoácidos, fosfolipídios, bases de DNA e ácidos orgânicos. Embora ainda discutível, o $\bullet\text{OH}$ pode ser gerado fisiologicamente a partir da reação de H_2O_2 e metais de transição, conforme demonstrado na reação de Fenton/Haber-Weiss (Equação 10) (WALLIING *et al.*, 1975; CHEN; SCHOPFER, 1999; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000; KEHRER, 2000).



+



Equação 10



Nos organismos superiores, a produção dessas moléculas reativas é neutralizada pelas defesas antioxidantes, estabelecendo uma homeostase no metabolismo oxidativo. Estas espécies reativas desempenham inúmeras funções fisiológicas e são necessárias para os seres humanos. Porém, em certas condições patológicas, pode haver um desequilíbrio na homeostase, ocasionando um excesso de produção de espécies reativas estabelecendo-se o estado denominado de estresse oxidativo, em que predominam suas ações lesivas no organismo (SIES, 1997). Tal situação está intimamente relacionada com o desenvolvimento e ou proliferação de diversas condições patológicas, como o câncer, o processo aterosclerótico, o mal de Parkinson e outras doenças neurodegenerativas, além da artrite reumatóide e outros processos inflamatórios, entre outros (KEHRER, 1993; THOMAS; KALIANARAMAN, 1997).

2.5. Alvos moleculares das espécies reativas e reações biológicas envolvidas

As espécies reativas danificam principalmente os lipídios, as proteínas e o DNA, pelas três primeiras das quatro reações químicas características demonstradas na Tabela 3, além de afetarem o metabolismo do cálcio e dos metais (KEHRER, 1993; THOMAS; KALIANARAMAN, 1997).

Tabela 3: Reações químicas características das espécies reativas descritas por Kehrer (1993).

Adição	$X + RCH = CHR \rightarrow RCH(X) - CHR$ ou $X^{\bullet} + RCH = CHR \rightarrow RCH(X) - \bullet CHR$
Transferência de elétrons	$X^{\bullet} + Y \rightarrow X + Y^{\bullet}$
Abstração de hidrogênio	$X^{\bullet} + RH \rightarrow XH + R^{\bullet}$
Terminação	$X^{\bullet} + X^{\bullet} \rightarrow X_2$

Nota: o símbolo X representa esquematicamente uma espécie reativa; X^{\bullet} representa esquematicamente um radical livre; os demais símbolos representam esquematicamente um substrato oxidável.

Em princípio, a situação de estresse oxidativo pode resultar tanto da situação de diminuição de antioxidantes quanto do aumento da produção de EROs e ERNs. A primeira ocorre basicamente de duas formas: através de mutações genéticas que afetam as defesas antioxidantes enzimáticas e da depleção de antioxidantes ou de seus constituintes essenciais na dieta. Já a segunda situação ocorre em situações de exposição à elevadas concentrações de O_2 , à presença de toxinas que produzem espécies reativas quando metabolizadas, e/ou à excessiva ativação de sistemas fisiológicos também produtores de espécies reativas, como ocorre na ativação de fagócitos em doenças inflamatórias crônicas como por exemplo, a artrite reumatóide e colite ulcerativa (THOMAS; KALYANARAMAN, 1997). Deste modo, em uma situação de estresse oxidativo, pode ocorrer uma alteração na homeostase do metabolismo celular, propagando os danos às células.

O total de cálcio celular é alto, todavia, os níveis de cálcio livre intracelulares são baixos, na ordem de $0,1 \mu M$. O cálcio intracelular está armazenado na mitocôndria, no retículo endoplasmático e ligado em proteínas moduladoras. A manutenção da concentração de cálcio em níveis baixos também é realizada pela Cálcio-ATPase, dependente de ATP, presente na membrana plasmática, a qual transporta cálcio de dentro para fora da célula. Em condições

de estresse oxidativo, ocorre um desequilíbrio na homeostase do cálcio, ocasionando uma hiperatividade celular dependente de cálcio, como a hiperativação da fosfolipase A_2 ; da óxido nítrico sintase; de proteases como a calpaína, que entre outras ações promovem a ativação da xantina desidrogenase, levando a formação de superóxido; e de endonucleases dependentes de cálcio, que podem acarretar a fragmentação de DNA e morte celular (MÉNARD; EL-AMINE, 1996; YAO *et al.*, 1996).

Além do metabolismo do cálcio, um estresse oxidativo pode promover alterações no metabolismo dos metais. Os metais de transição, como o Fe^{++} e o Cu^{++} , são potenciais catalizadores de reações de formação de espécies reativas, conforme demonstrado na Equação de Fenton/Haber-Weiss (Equação 10). Deste modo, uma situação de estresse oxidativo pode promover a liberação destes metais de seus sítios de ligação, estabelecendo-se um ciclo de “feed-back” positivo. O $O_2^{\bullet-}$ e o NO^{\bullet} , por exemplo, podem provocar a liberação do Fe^{++} da ferritina, peróxidos podem provocar a liberação do Fe^{++} de heme-proteínas, citocromo *c* e P_{450} , e, o $ONOO^-$ e/ou proteases ativadas podem provocar a liberação do Cu^{++} da ceruloplasmina (GUTTERIDGE, 1986; REIF; SIMMONS, 1990; PALLER; JACOB, 1994).

As membranas biológicas, um dos principais alvos de EROs e ERNs, são responsáveis por delimitar compartimentos intra e extra-celulares, por criar gradientes químicos e elétricos, por regular o transporte de solutos entre os meios intra e extra-celulares, e por favorecer a transdução de sinais, entre outras funções (YEAGLE, 1993). Estas funções, essenciais para a sobrevivência das células, são afetadas principalmente pela composição química, estado físico e pelo modo organizacional da membrana lipídica. Deste modo, os danos oxidativos aos ácidos graxos (tanto das membranas celulares quanto das membranas de organelas citoplasmáticas) alteram as propriedades das membranas, ocasionando a perda das funções e conseqüentemente a morte celular.

A peroxidação lipídica, segundo Halliwell e Gutteridge (2000) foi definida por A. L. Tappel como “a deterioração oxidativa de lipídios poliinsaturados”. Os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) são mais facilmente oxidados por espécies

reativas do que os monoinsaturados ou saturados, por possuírem ligações duplas conjugadas, em que o hidrogênio bis-alílico presente possui uma menor energia de dissociação que facilita o processo de abstração (KOPPENOL, 1990; WAGNER *et al.*, 1994) (Figura 10).

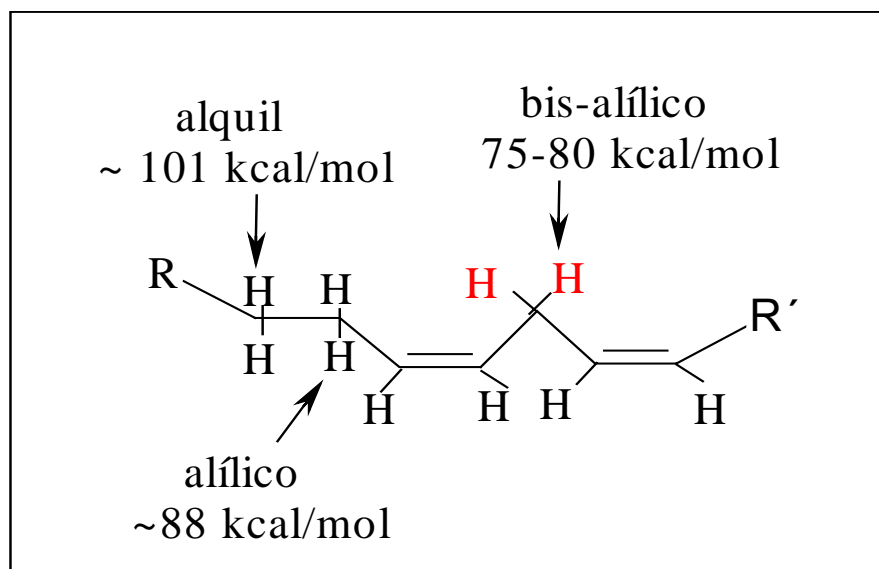


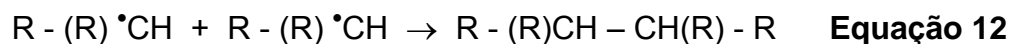
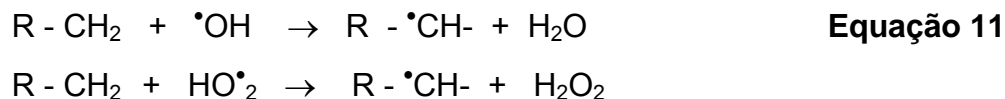
Figura 10: Energias de dissociações das ligações C – H para hidrogênios bis-alílicos, alílicos e alquis de cadeias de hidrocarbonetos (WAGNER *et al.*, 1994).

Termodinamicamente, os radicais hidroxil (OH^\bullet), hidroperoxil (HO_2^\bullet), alcóxil (RO^\bullet) e peróxil (RO_2^\bullet) são as principais moléculas reativas capazes de iniciar uma reação lipoperoxidativa. A lipoperoxidação é iniciada pela abstração do hidrogênio bis-alílico com a posterior formação de uma espécie radicalar centrada no carbono (Equação 11) (SEVIAN *et al.*, 1990; AIKENS; DIX, 1991; WAGNER *et al.*, 1994; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000).

Entretanto, já foi relatado na literatura que o ONOO^- e o radical ascorbil (Asc^\bullet) também podem promover a oxidação de membranas (CASALINO *et al.*, 1996, STAMBRO, 2000).

Este radical centrado no carbono pode rearranjar-se formando um dieno conjugado (Equação 12), ou, em condições aeróbicas, pode reagir com o O_2 e

formar os peroxi radicais (Equação 13). Estes, por sua vez, também são capazes de abstrair um átomo de hidrogênio de outro lipídio, formando outro radical centrado no carbono, desencadeando, assim, a propagação da lipoperoxidação. Além disso, estes radicais peroxis podem ciclizar ocorrendo a formação de endoperóxidos, como os isoprostanóides, e a conseqüente geração de produtos finais da peroxidação lipídica, como o dialdeído malônico (MDA) e 4-hidroxi-alcenais (4-HDA). O processo de peroxidação lipídica está resumidamente demonstrado na Figura 11 (WAGNER *et al.*, 1994; KEHRER, 2000).



Como descrito, deve-se ressaltar que os próprios intermediários da cascata da reação de lipoperoxidação participam do processo, em uma forma de “feed-back” positivo, propagando o efeito lesivo. Além disso, os produtos finais da peroxidação lipídica, como o MDA, podem promover a oxidação de outras macromoléculas como as proteínas (YORIAKA *et al.*, 1996; LEVINE, 2002; DALLA-DONNE *et al.*, 2003).

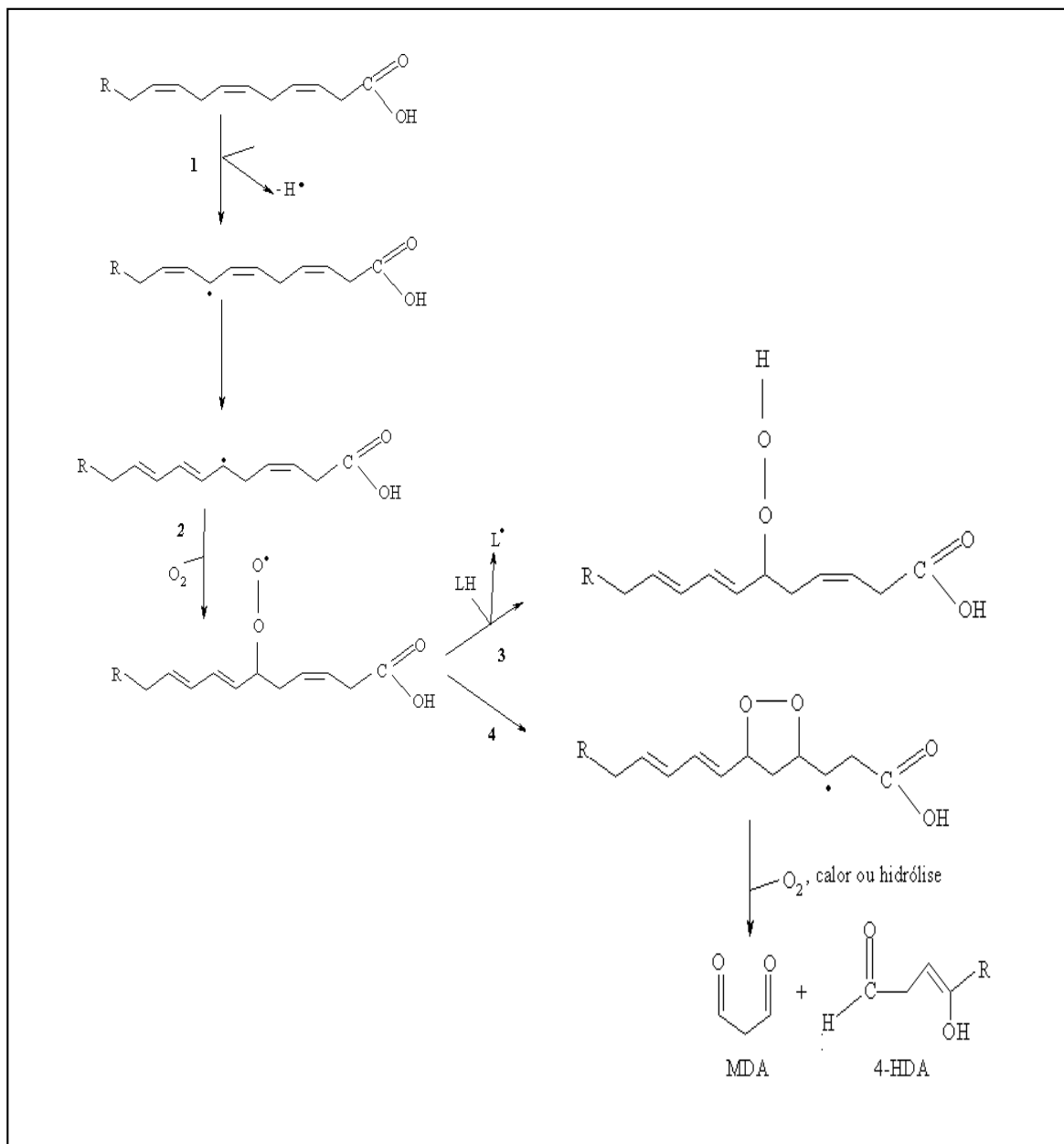


Figura 11: Esquema da reação de lipoperoxidação de ácidos graxos poli-insaturados. 1: abstração de hidrogênio da cadeia poli-insaturada de lipídios de membrana; 2: formação de radical peroxil; 3: formação da segunda espécie

radical centrada no carbono; 4: formação de endoperóxidos. Adaptado de Halliwell e Gutteridge (2000).

As proteínas desempenham muitas funções celulares, atuando como receptores, como enzimas (catalizadores de reações celulares), como segundos mensageiros na transdução de sinais, como transportadores e como canais iônicos, entre outros. Deste modo, ERNs e EROS podem oxidar as proteínas e prejudicar as funções por elas exercidas. Além das espécies reativas, metabólitos secundários de danos oxidativos, como radicais intermediários e produtos finais da lipoperoxidação e os próprios intermediários da oxidação protéica, também podem oxidá-las (RADI *et al.*, 1994; LEVINE, 2002; DALLA-DONNE *et al.*, 2003).

Como há uma vasta heterogeneidade estrutural e constitutiva das proteínas nos seres vivos, existem inúmeras modificações oxidativas possíveis, não havendo ainda um marcador universal da oxidação protéica (DALLA-DONNE *et al.*, 2003). As modificações oxidativas em proteínas podem ser sítio específicas, com a formação de um produto específico de um resíduo oxidado; ou não-específicas, com a alteração de múltiplos resíduos de aminoácidos, gerando inúmeros subprodutos diferentes (LEVINE, 2002). Além disso, há uma especificidade natural da oxidação de proteínas, em que algumas EROs e/ou ERNs provocam modificações particulares e específicas. A formação de clorotirosil e amino acil adutos em resíduos de lisina, por exemplo, são características da ação oxidativa do HOCl em proteínas, assim como a formação de 3-nitro-tirosina por ação do ONOO^- (DALLA-DONNE *et al.*, 2003).

Por outro lado, a formação de grupamentos carbonílicos é uma oxidação comum às proteínas e são característicos da oxidação de múltiplos resíduos de aminoácidos. A reação de carbonilação de proteínas pode ser ocasionada por diversas espécies reativas, como pelos produtos da degradação do ONOO^- , principalmente em pH básico (TIEN *et al.*, 1999), pelo HOCl (YAN *et al.*, 1996), pelas espécies reativas $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , dióxido de dinitrogênio (N_2O_2), por produtos da oxidação de açúcares e pelos próprios intermediários reativos da oxidação de proteínas (BERLETT *et al.*, 1997), bem como por produtos da peroxidação lipídica (REFSGAARD *et al.*, 1999). Os danos oxidativos em

proteínas causados por EROs e ERNS podem ser reparados ou a proteína afetada pode ser degradada dependendo da etiologia do dano. Glutathione oxidada (GSSG), por exemplo, pode ser re-reduzida por ação da enzima glutathione redutase (GR), e a formação de sulfóxido de metionina, principalmente por ação de RO_2^\bullet , RO^\bullet , ONOO^- , HOCl e/ou $^\bullet\text{OH}$, pode ser reparada pelo sistema sulfóxido metionina redutase (MOSKOVITZ, J. *et al.*, 1991; SIES, 1999; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000). Todavia, outros danos protéicos como a nitração e a carbonilação de proteínas, entre outros, não podem ser reparados e a proteína afetada é degradada por um complexo multicatalítico de proteases (proteassomos) (HILT; WOLF, 1996; BERLETT *et al.*, 1997). Na Figura 12 pode-se observar a correlação entre os sistemas de defesa antioxidante e a ação de agentes pró-oxidantes protéicos, bem como a ação de proteases na degradação de proteínas oxidadas.

As espécies reativas também estão envolvidas no processo de desenvolvimento de câncer, não somente por atacarem quimicamente o DNA, mas também por outros mecanismos que afetam direta ou indiretamente a transdução de sinais, a comunicação intercelular, a eficiência do sistema de reparo, a proliferação e a morte celular, entre outros (AMSTAD *et al.*, 1992; DATTA *et al.*, 1992).

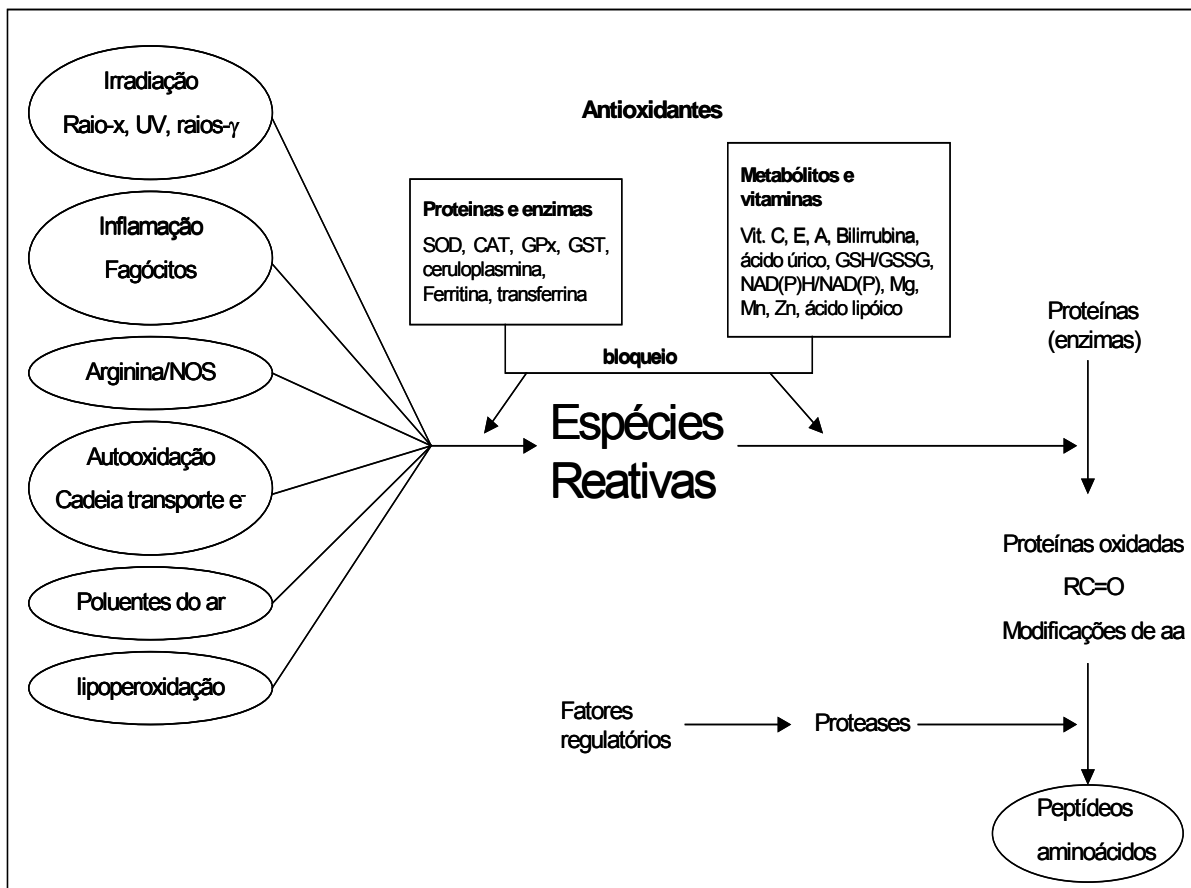


Fig 12: Esquema da relação entre a ação de sistemas pró-oxidantes e antioxidantes na oxidação de proteínas, e o sistema proteolítico de proteínas oxidadas (BERLETT *et al.*, 1997).

Fisiologicamente, $\cdot\text{OH}$, HOCl e ONOO^- são as mais relevantes espécies reativas capazes de atacar quimicamente o DNA, que pode ser tanto nas bases nitrogenadas quanto nas suas porções açúcar. Além disso, há evidências de que H_2O_2 , $\text{NO}\cdot$, $\text{O}_2\cdot^-$ também ocasionam danos ao DNA, principalmente pelos seus metabólitos (WHITEMAN *et al.*, 1999; HALLIWELL, 1999). As alterações estruturais no DNA, bem como alterações no crescimento celular, ocorrem devido a um conjunto de fatores que propiciam tal evento, e não a um fenômeno isolado, conforme pode ser visualizado esquematicamente na Figura 13.

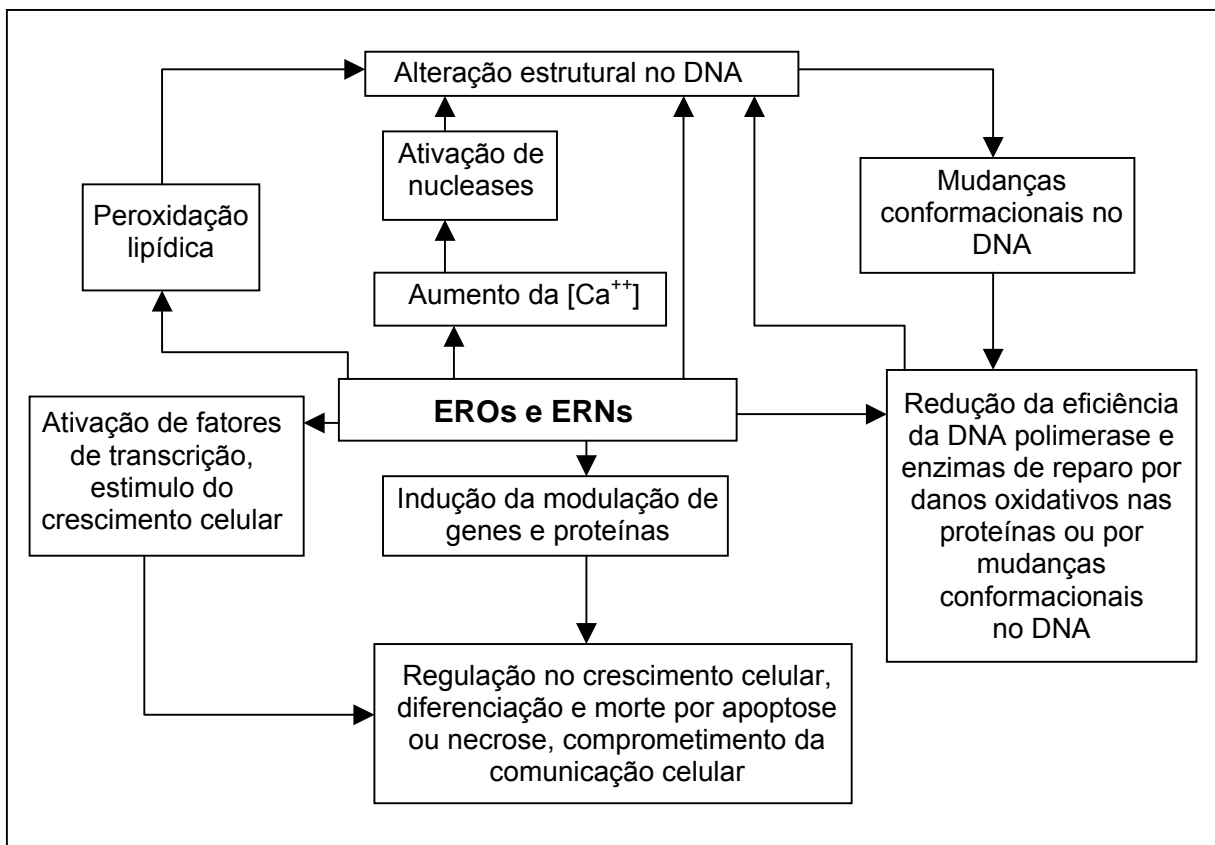


Figura 13: Demonstração esquemática de alguns mecanismos pelos quais o estresse oxidativo pode afetar o DNA e o crescimento celular. Pode-se visualizar que estes eventos ocorrem devido a um conjunto de fatores (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000).

A ação oxidativa de espécies reativas nas células é bastante complexa e multifatorial. O estresse oxidativo envolve, ao mesmo tempo, a ação de várias espécies reativas tanto de oxigênio quanto de nitrogênio e a formação de seus intermediários e produtos finais. Além disso, afetam as células de uma forma múltipla, afetando as macromoléculas de uma maneira conjunta, conforme pode ser demonstrado resumidamente na Figura 14.

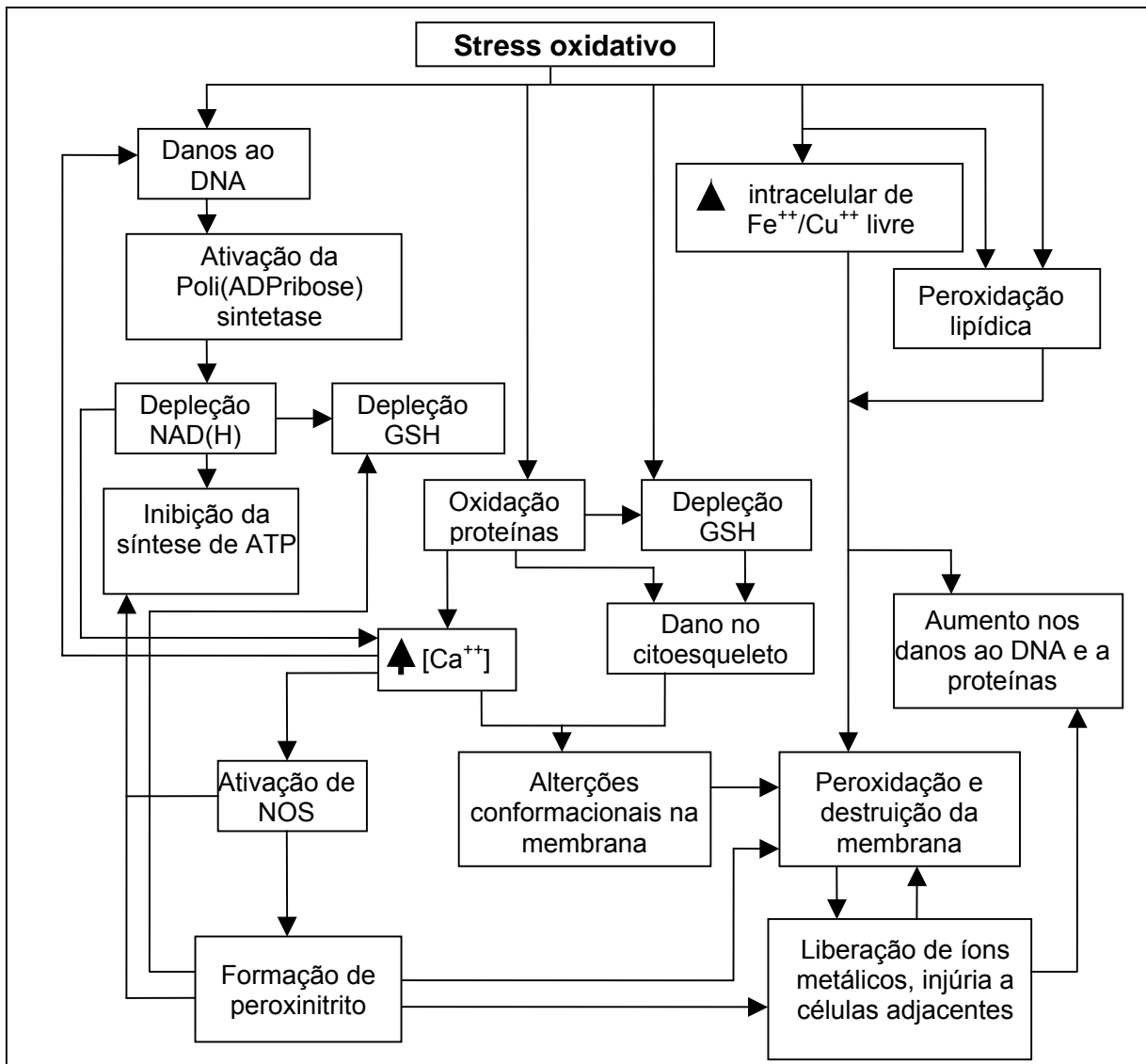
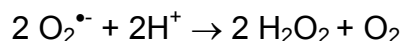


Figura 14: Esquema demonstrando os aspectos multifatoriais dos danos celulares induzidos por espécies reativas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000).

2.6. Antioxidantes

Os antioxidantes são moléculas que atuam na manutenção da homeostase do metabolismo oxidativo. São moléculas capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis, além de atuarem como agentes redutores de substâncias de interesse em concentrações menores ou iguais às dos substratos. Os antioxidantes podem ser classificados em dois grandes grupos, em enzimáticos e não enzimáticos. Dentre os enzimáticos destacam-se a catalase, a superóxido dismutase, a glutathione transferase e a glutathione peroxidase, entre outras enzimas recentemente descritas, como é o caso do sistema de tioredoxinas. Dentre os não enzimáticos, podemos citar a glutathione, como a principal molécula antioxidante intracelular, a melatonina, a melanina, os estrogênios e o ácido úrico, entre outros (SIES, 1997; NORDBERG; ARNÉR, 2001). O organismo, além do sistema antioxidante endógeno, conta com compostos antioxidantes da dieta de baixo peso molecular que direta ou indiretamente auxiliam na homeostase do metabolismo oxidativo (SIES, 1997; SIES; STAHL, 2004; STAHL; SIES, 2005). As defesas antioxidantes não atuam isoladamente, elas agem em sistemas de oxido-redução envolvendo as defesas enzimáticas e as não enzimáticas. Deste modo, a seguir estão explicados alguns dos principais sistemas de defesa antioxidante de interesse biológico.

As superóxido dismutases (SOD) foram as primeiras enzimas metabolizadoras de EROs descritas (McCORD; FRIDOVICH, 1969; NORDBERG & ARNÉR, 2001). Existem dois tipos de SOD, um tetrâmero de 80 Kd presente nas mitocôndrias Mn-SOD, e um dímero de 32 Kd presente no citosol Cu/Zn-SOD. Estas enzimas são catalizadores da dismutação de $O_2^{\bullet -}$, formando H_2O_2 , conforme descrito na Equação 14. A presença mitocondrial de SOD é essencial devido à formação de altas concentrações de $O_2^{\bullet -}$ pela cadeia respiratória (Figura 15). (McCORD; FRIDOVICH, 1969; FRIDOVICH, 1995; NORDBERG; ARNÉR, 2001)



Equação 14

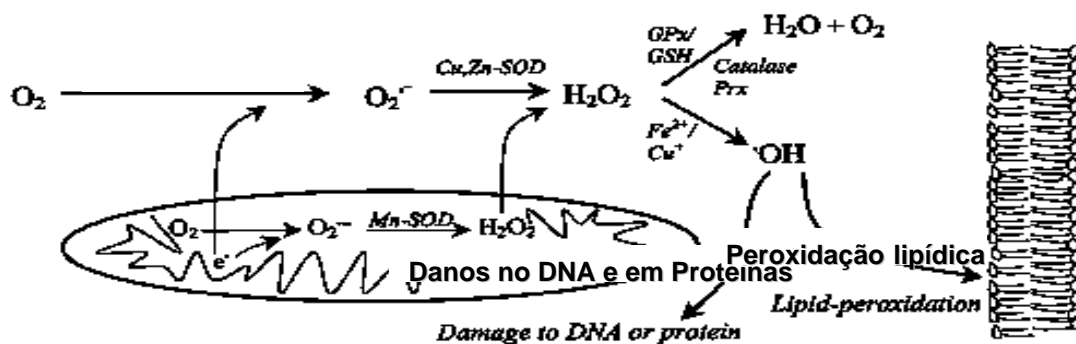


Figura 15: Esquema simplificado da ação das SOD mitocondriais e citosólicas (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

Além disso, a SOD tem uma grande importância na prevenção da formação do $ONOO^-$, ao impedir a conjugação do $O_2^{\bullet -}$ com o NO^\bullet . Quando formado, o $ONOO^-$ pode inativar a SOD e estabelecer um “feed-back” positivo, aumentando a disponibilidade de $O_2^{\bullet -}$ para reagir com o NO^\bullet , conforme pode ser observado na Figura 16 (RADI *et al.*; 2002).

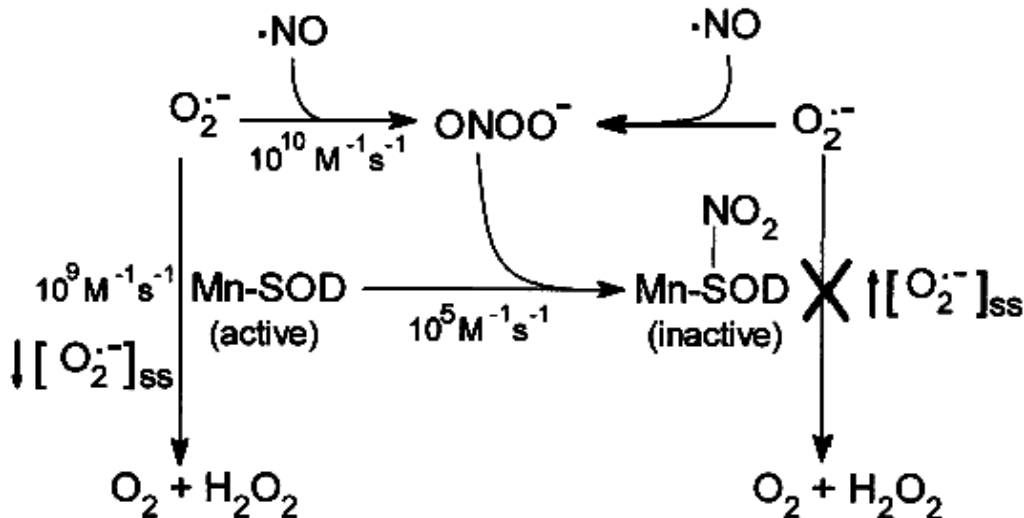


Figura 16: Reações entre o NO^\bullet e $O_2^{\bullet -}$ e a ação da Mn-SOD na mitocôndria (RADI *et al.*, 2002).

Recentemente, um novo tipo de enzimas metabolizadoras de superóxido foram descritas, catalizando a redução direta do superóxido à peróxido de hidrogênio (Equação 15). As superóxido redutases (SOR) são enzimas presentes em anaeróbios, como o *Pyrococcus furiosus* e microaerófilos como o *Treponema pallidum*, e que até o momento não foram encontradas em mamíferos (JENNEY *et al.*, 1999; NORDBERG; ARNÉR, 2001).



Equação 15

As catalases (CAT) são enzimas compostas por quatro sub-unidades protéicas, com um grupamento ferro-hemínico como sítio ativo. Localizam-se predominante nos peroxissomos onde é catalizada a dismutação das moléculas de H_2O_2 formadas, principalmente pela ação das glicolato oxidases e flavoproteína oxidases (esquema 5). Sua função é muito importante, pois previne a formação do $\cdot\text{OH}$ via reação de Fenton catalisada por $\text{Fe}^{++}/\text{Cu}^{++}$ (LONG *et al.*, 1999; HALLIWELL, 1999; NORDBERG; ARNÉR, 2001). Além das catalases, as peroxidases também removem o H_2O_2 utilizando outros substratos oxidáveis (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000), conforme demonstrado na Equação 7.

O sistema glutathiona é o mais conhecido sistema antioxidante descrito nos mamíferos. Compreende diferentes sistemas enzimáticos, como peroxidases (GPx), transferases (GST) e redutases (GR), além do próprio tripeptídeo L- γ -glutamil-L-cistetil-glicina (glutathiona; GSH; Figura 17) (SIES, 1999; ARTEEL; SIES, 2001).

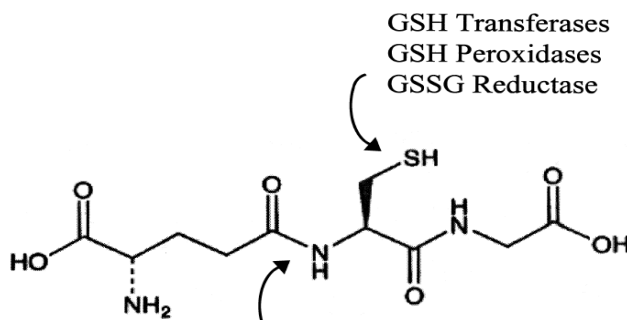


Figura 17: Estrutura química da glutathiona e o seu sítio ativo de enxofre.

O sistema enzimático Glutathione peroxidases (GPx) compreende quatro diferentes tipos (GPx 1-4) conforme a sua localização. As GPx1 e GPx4 são enzimas citosólicas abundantes em muitos tecidos, enquanto a GPx2 (gastrointestinal) e GPx3 (plasmática) são mais expressas, respectivamente, no trato gastrointestinal e no fígado (MATES, 1999; NORDBERG; ARNÉR, 2001). Todas estas GPx, utilizando glutathione como substrato, são capazes de reduzir peróxidos, como peróxido de hidrogênio e lipoperóxidos, a álcoois (Equação 16).



Equação 16

As GPx são enzimas constituídas por quatro sub-unidades protéicas que possuem um átomo de selênio em seu sítio ativo. Estas enzimas atuam através da oxidação deste sítio selenoato (Se^-) a ácido selênico (proteína- SeOH), que é regenerado, posteriormente, com a adição de duas moléculas de glutathione, com a formação de um intermediário (Se-SG), formando um aduto GSSG final (MAIORINO, 1995; ARTEEL *et al.*, 1999).

As GST, por sua vez, geralmente promovem a formação de adutos glutathione S-conjugados para posterior excreção, atuando como detoxificadores (ARTEEL *et al.*, 1999; SIES, 1999). Já as GR são enzimas capazes de reduzir os complexos GSSG a 2GSH, com a utilização de cofatores como NADPH (ARTEEL *et al.*, 1999; SIES, 1999; ARTEEL; SIES, 2001).

A glutathione é o mais abundante tiol-antioxidante intracelular, prevalecendo na faixa de concentração milimolar na maioria das células aeróbicas (SIES, 1999; ARTEEL *et al.*, 1999; ARTEEL; SIES, 2001, NORDBERG; ARNÉR, 2001). As reações redox envolvendo a GSH envolvem as GPx, GST e GR, e podem ser esquematicamente descritas na Figura 18 (MATES, 1999; NORDBERG; ARNÉR, 2001).

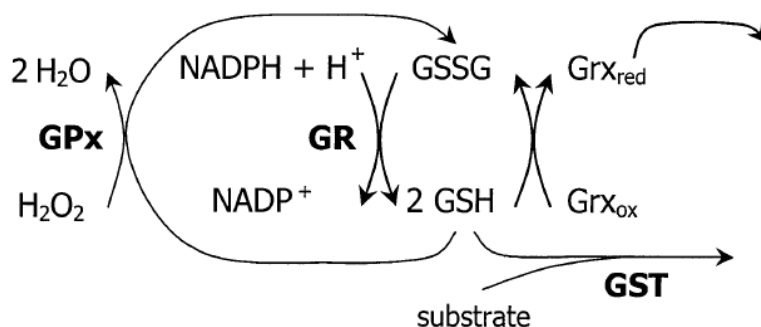
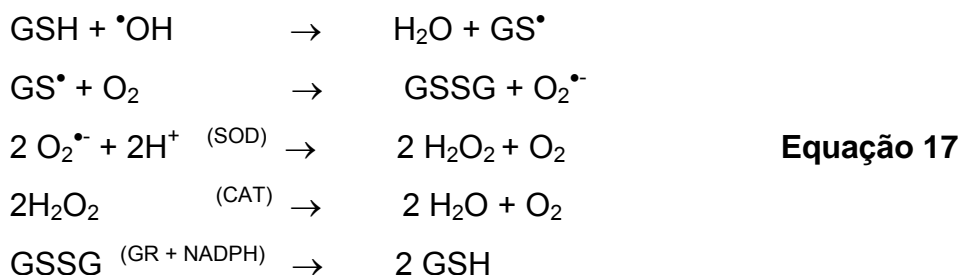


Figura 18: Esquema resumido do ciclo redox do sistema glutatona (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

A glutatona também pode atuar diretamente neutralizando espécies reativas, tornando-se um intermediário radicalar, num ciclo redox, até a sua regeneração e neutralização do elétron desemparelhado envolvendo outros sistemas enzimáticos, conforme descrito na Equação 17 (SIES, 1999; ARTEEL; SIES, 2001; NORDBERG; ARNÉR, 2001):



Além do sistema glutatona, pode-se citar o sistema tioredoxina (NADPH, Tioredoxina redutase -TrxR- e tioredoxina -Trx) (NORDBERG; ARNÉR, 2001), compostos de selênio (KLOTZ; SIES, 2003), peroxiredoxinas (Prx) (ARTEEL; SIES, 2001; MANEVICH; FISCHER, 2005), e outros sistemas, bem como produtos endógenos como bilirrubina, alfa-ceto-ácidos, hormônios sexuais, melatonina, melanina e ácido úrico, entre outros, que direta e ou indiretamente também atuam na manutenção do “status oxidativo”.

Adicionalmente, os seres humanos contam com antioxidantes de baixo peso molecular de natureza muito variada obtidos da dieta. Entre estes, os

flavonóides constituem o grupo mais representativo, com uma grande diversidade de formas químicas (RICE-EVANS *et al.*, 1996). Adicionalmente, os carotenóides também chamam a atenção, pois possuem cerca de mil estruturas diferentes relatadas (WILHELM-FILHO *et al.*, 2001 e referências citadas) e o consumo está relacionado à redução de patologias associadas à fotooxidação (SIES; STAHL, 2004). Os tocoferóis, por sua vez, são moléculas lipossolúveis, assim como os carotenóides, e estão intimamente relacionados com a prevenção do processo aterosclerótico por inibir ou retardar a oxidação das LDL colesterol (KNOTT *et al.*, 2002). Além dessas, existem outras classes de compostos encontrados naturalmente com propriedades antioxidantes descritas na literatura, como terpenóides, cumarinas, saponinas, ácido cinâmico, entre outros (RICE-HEVANS *et al.*, 1996; MANACH *et al.*, 1999). Adicionalmente, alguns antioxidantes amplamente estudados têm sido empregados como suplementos dietéticos, destacando-se os tocoferóis, tocotrienóis, licopeno e o ácido ascórbico (WILHELM-FILHO *et al.*, 2001 e referências citadas).

A maioria dessas moléculas possui um grupamento fenólico em comum, sendo o principal responsável por este efeito biológico, assim como ocorre com o ácido gálico e com os galatos. As propriedades antioxidantes de compostos polifenólicos de plantas, estão relacionadas com as suas atividades como agentes redutores, doadores de hidrogênio e/ou seqüestradores de radicais livres (RICE-HEVANS *et al.*, 1996).

2.7. O uso de lipossomos como modelos de membranas

Os lipossomos possuem constituição lipídica similar a da matriz de células e organelas, e podem apresentar uma ou várias bicamadas, também chamadas de lamelas, simulando de forma eficiente determinadas características das membranas (YEAGLE, 1993; CASTELLI *et al.*, 1997).

Os lipossomos podem ser classificados, de um modo geral, de acordo com o seu tamanho em: a) vesículas grandes multilamelares (MLVs), que possuem um diâmetro superior a 400 nm, compostas por muitas lamelas heterogêneas em seus compartimentos internos e são preparadas, geralmente, a partir da dispersão de lipídios em meio aquoso, seguido de agitação; b) vesículas grandes unilamelares (LUVs), que apresentam diâmetros na faixa de 50-400 nm, são organizados em apenas uma bicamada e são preparadas a partir da filtração sob pressão em filtros de policarbonato de porosidade definida, sonicação, ou extrusão de uma amostra de MLV; e vesículas pequenas unilamelares (SUVs), que possuem diâmetro na faixa de 20-50 nm e são mais instáveis em relação aos dois primeiros tipos de lipossomos (HOPE *et al.* 1986; WILSCHUT; HOEKSTRA, 1986). A estrutura de um lipossoma unilamelar está representada na Figura 19.

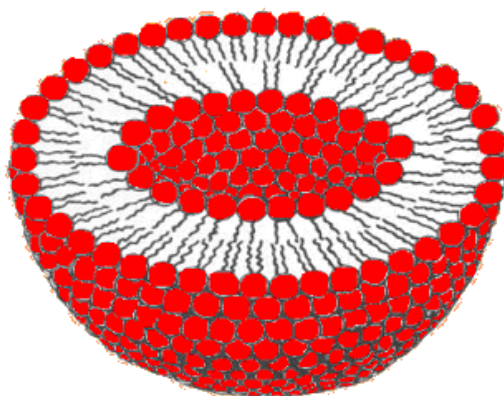


Figura 19: Corte transversal de um lipossoma unilamelar. Em vermelho, as cabeças polares; em preto, as caudas hidrofóbicas (disponível em www.dadairs.com/liposomes.htm).

O uso de lipossomos como modelos de membrana é bastante difundido cientificamente, e proporciona vantagens como a facilidade de produção, obtenção em grandes quantidades e maior facilidade de interpretação dos resultados face a complexibilidade das membranas celulares naturais (YEAGLE, 1993; CASTELLI *et*

al., 1997; TEIXEIRA *et al.*, 2003). Além disso, é possível trabalhar com diferentes constituições lipídicas e estudar as alterações que estas diferenças constitucionais podem provocar nas membranas (DE LIMA *et al.*, 2004).

Lipossomos de fosfatidilcolina têm sido amplamente utilizados como modelos de membranas para estudos de lipoperoxidação (DE LIMA *et al.*, 2004). Na Tabela 4 pode-se observar a heterogeneidade estrutural deste fosfolípido.

Tabela 4: Percentual de ácidos graxos presentes em fosfatidilcolina de soja (YEAGLE, 1993).

Ácido Graxo	Saturações : Insatudações	% na constituição
Palmítico	16:0	17
Esteárico	18:0	6
Oléico	18:1	13
Linoleico	18:2	59
Linolênico	18:3	5

A fosfatidilcolina é um ácido graxo poliinsaturado, pois possui várias insaturações na sua constituição. Além disso, é o fosfolípido majoritário na constituição de membranas celulares (YEAGLE, 1993). Deste modo, neste trabalho foram utilizados lipossomos de fosfatidilcolina como modelos de membranas lipídicas para estudos de lipoperoxidação.

3. Objetivos

3.1. Objetivos gerais

Este trabalho tem como objetivo geral estudar as propriedades antioxidantes *in vitro* de ésteres sintéticos do ácido gálico, bem como avaliar a influência da lipofilicidade destes compostos nesta atividade.

3.2. Objetivos específicos

Como objetivos específicos este trabalho visa:

- Estudar a capacidade dos derivados n-alkil-ésteres sintéticos do ácido gálico em:
 - ✓ Inibir a atividade da enzima mieloperoxidase;
 - ✓ Seqüestrar HOCl;
 - ✓ Seqüestrar NO[•];
 - ✓ Proteger a lipoperoxidação em lipossomos de fosfatidilcolina induzida pelo radical ascorbil;
 - ✓ Proteger a lipoperoxidação em lipossomos de fosfatidilcolina induzida pela espécie reativa peroxinitrito;
- Estudar a citotoxicidade destes compostos em tecido hepático de ratos.
- Incorporar os compostos mais ativos em lipossomos de fosfatidilcolina por duas metodologias: pelo método de extrusão e pelo método de diálise.
- Calcular o coeficiente de extinção molar dos compostos.
- Realizar uma análise de rendimento de incorporação entre as duas metodologias utilizadas.

- Verificar se o processo de incorporação incrementa a proteção das membranas contra a peroxidação.
- Avaliar a influência da lipofilicidade na atividade antioxidante *in vitro*.

4. Materiais e Métodos

4.1. MATERIAIS

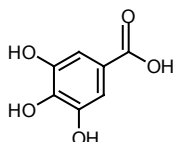
4.1.1. Materiais, reagentes e equipamentos:

Os fosfolípidios utilizados foram da Avanti Polar Lipids[®] (Alabaster, AL). Todos os solventes orgânicos utilizados foram da Merck[®] (Darmstadt, Germany). Os demais reagentes (sais, tampões, etc) e equipamentos foram os disponíveis no laboratório e são rotineiramente utilizados nas linhas de pesquisa do Laboratório de Bioenergética e Bioquímica de Macromoléculas.

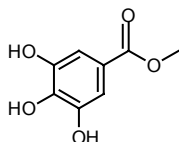
4.1.2. Compostos derivados do ácido gálico (galatos):

O ácido gálico e seus n-alquil-ésteres foram fornecidos pelo grupo do Prof. Dr. Rosendo A. Yunes, do Departamento de Química da UFSC. Para facilitar o estudo, os compostos foram numerados de 1 a 15 conforme o número de carbonos de sua cadeia alifática lateral, são eles:

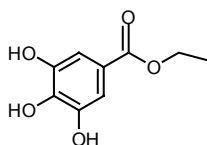
Composto 1: Ácido Gálico ($C_7H_6O_5$; PM=170,11)



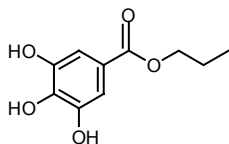
Composto 2: Galato de Metila ($C_8H_8O_5$; PM= 184,14)



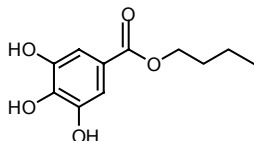
Composto 3: Galato de Etila ($C_9H_{10}O_5$; PM= 198,17)



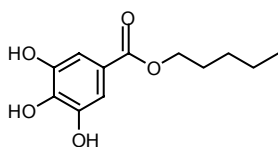
Composto 4: Galato de Propila ($C_{10}H_{12}O_5$; PM=212,19)



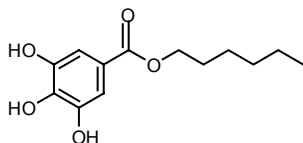
Composto 5: Galato de Butila ($C_{11}H_{14}O_5$; PM=226,22)



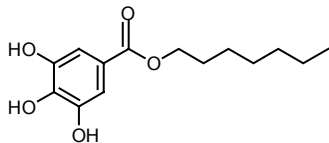
Composto 6: Galato de pentila ($C_{12}H_{16}O_5$ PM=240,25)



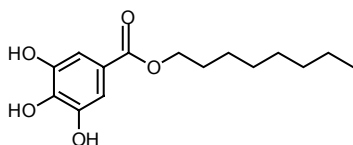
Composto 7: Galato de hexila ($C_{13}H_{18}O_5$; PM= 254,28)



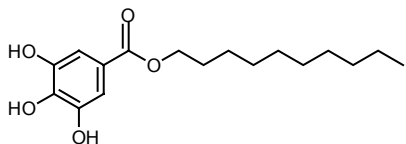
Composto 8: Galato de heptila ($C_{14}H_{20}O_5$; PM=268,30)



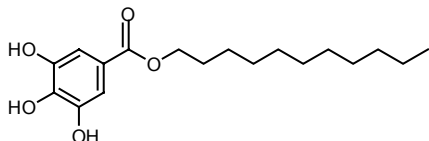
Composto 9: Galato de octila ($C_{15}H_{22}O_5$; PM= 282,33)



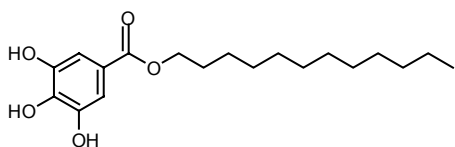
Composto 10: Galato de decila ($C_{17}H_{26}O_5$; PM= 310,38)



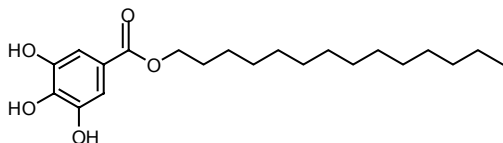
Composto 11 Galato de undecila ($C_{18}H_{28}O_5$; PM= 324,41)



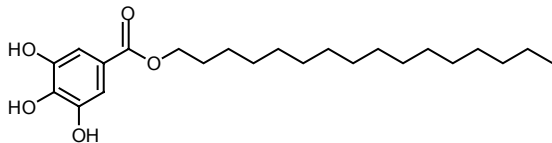
Composto 12: Galato de dodecila ($C_{19}H_{30}O_5$; PM=338,44)



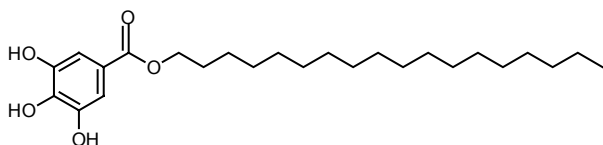
Composto 13: Galato de tetradecila ($C_{21}H_{34}O_5$; PM=366,49)



Composto 14: Galato de hexadecila ($C_{23}H_{38}O_5$; PM=393,54)



Composto 15: Galato de octadecila ($C_{25}H_{42}O_5$; PM = 422,60)



4.2. Metodologia:

4.2.1. Animais:

Para obtenção dos fígados necessários para o ensaio de viabilidade celular e dos pulmões necessários para a obtenção da enzima mieloperoxidase, foram utilizados ratos wistar descartados pelo laboratório da Profa. Dra. Fátima Regina M. B. da Silva, conforme aprovado pelo protocolo CEUA número 02512003. Estes animais não sofreram tratamento de espécie alguma, pois são os animais controles dos experimentos realizados naquele laboratório.

4.2.2. Avaliação da citotoxicidade em fatias de fígado de ratos pelo método da redução do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio):

Fatias de fígado de ratos com 400µm foram incubadas em uma microplaca de elisa (1 fatia/poço), por 1 hora a 37°C na presença e ausência dos compostos (até 200 µM), em um meio contendo 25mM de Hepes, 12mM de glicose, 1mM de CaCl₂, 124mM de NaCl, 4mM de KCl e 1,2mM de MgSO₄. Após este período, o meio de reação foi substituído por outro contendo 0,5 mg/mL de MTT e incubado por mais 45 minutos a 37°C. Posteriormente, foi retirado o meio reacional e o formazan púrpura formado pela redução do MTT pelas desidrogenases celulares, principalmente mitocôndrias, proporcional à viabilidade celular, foi dissolvido em DMSO e determinado espectrofotometricamente a 550nm (SZABÓ *et al.*, 1994; LIU *et al.* 1997; CORDOVA *et al.*, 2002). A citotoxicidade dos compostos foi analisada através de uma correlação com as amostras do grupo controle (amostras incubadas na ausência de galatos).

4.2.3. Preparo do homogenato de pulmão de ratos

Os pulmões dos animais não-tratados foram homogeneizados em tampão fosfato 0,1 M (0°C), pH 7.4, contendo 0,5 % de brometo de trimetilamônio. Posteriormente, este homogenato foi congelado (em nitrogênio líquido) e descongelado à 37°C por três vezes para o rompimento das células e liberação da

mieloperoxidase da membrana. Posteriormente, o homogenato foi centrifugado a 12000 g, por 20 minutos a 4°C, e o sobrenadante, contendo a enzima, foi aliquotado para a dosagem da concentração protéica e para a realização dos ensaios referentes à ação dos galatos sobre a atividade enzimática (DANSON *et al.*, 1986).

4.2.4. Determinação da concentração protéica:

A determinação da concentração protéica foi realizada em triplicatas pelo método de Lowry *et al* (1951). Em um volume final de 1 mL, completado com H₂O destilada, uma alíquota de 5 µL de amostra foi adicionada a 750 µL de uma solução alcalina (8mL de Na₂CO₃ 2% em NaOH 0,4%, 80 µL de tartarato de sódio 2% e 80 µL de CuSO₄ 1%) e incubados por 10 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 75 µL do reagente de Folin diluído 1:2 e as amostras foram incubadas novamente por mais 30 minutos nas mesmas condições. Após o período de incubação, as amostras foram monitorados espectrofotometricamente a 660 nm e as concentrações protéicas foram determinadas com o auxílio de uma curva padrão de albumina sérica bovina.

4.2.5. Ensaio de atividade dos compostos sobre a mieloperoxidase

Na presença e ausência de crescentes concentrações dos galatos, o sobrenadante, obtido em 4.2.3, foi ensaiado em um meio de reação constituído de tampão fosfato 50 mM (NaH₂PO₄), pH 6.0 a 25°C, contendo θ -dianisidina- 2 HCl (0,167 mg/mL) e H₂O₂ (0,005 %). A atividade da enzima foi monitorada pela absorção do produto de oxidação da θ -dianisidina pelo HOCl formado, a 450 nm. Os resultados foram analisados utilizando-se a variação do desvio óptico da oxidação da θ -dianisidina por segundo ($\Delta DO/s$) obtida através do cálculo da tangente da curva. Os resultados da inibição da oxidação da θ -dianisidina foram avaliados através de uma análise de correlação em comparação com o controle (Rao *et al.*, 1994).

4.2.6. Monitoramento do radical NO[•] pelo método de Griess:

Para o ensaio de monitoramento da reatividade dos compostos com o radical NO[•], foi adaptado o ensaio descrito por Creczynski-Pasa *et al.* (2001). O ensaio baseou-se na incubação dos compostos em estudo com um doador de NO[•], monitorando a produção de nitrito obtido com a sua reação com o oxigênio, com o reagente de Griess (sulfanilamida 1% em H₃PO₄ 5% e 2- α -naftil-etilenodiamina 0,1% em H₂O 1:1). Desta forma, 40 mM de nitroprussiato de sódio (NaNPS) (doador de NO[•]) foi incubado na ausência e na presença de crescentes concentrações dos galatos em um meio contendo 20 mM de NaH₂PO₄, pH 7,2, por 30 minutos a 37 °C. Posteriormente, a quantidade de nitrito formado, proporcional a quantidade de NO[•] livre que reagiu com o oxigênio, foi determinado espectrofotometricamente a 543 nm após 10 minutos da adição do reagente de Griess (GREEN *et al.*, 1982). A quantidade de NO₂⁻ formada foi calculada utilizando-se uma curva padrão de nitrito obtida com a mesma metodologia.

4.2.7. Monitoramento da reatividade com o HOCl: utilização do método da oxidação do TNB (ácido 5-tio-2-nitrobenzóico):

O ensaio basou-se no monitoramento espectrofotométrico da oxidação do TNB pelo HOCl (CHING *et al.*, 1994). O HOCl utilizado para este ensaio foi obtido a partir do reagente hipoclorito de sódio 4-6% (coeficiente de absorção molar = 350 M⁻¹.cm⁻¹ em 290 nm).

4.2.7.a. Obtenção do TNB: o TNB foi obtido através da redução de 1mM de DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico) em KH₂PO₄ (50mM), pH 6.6, na presença de 5mM de EDTA, por 30 minutos a 37 °C, com 20mM de NaBH₄ (borohidreto de sódio), e a concentração obtida foi determinada espectrofotometricamente através de seu coeficiente de extinção molar = 13600 M⁻¹.cm⁻¹ em 412 nm.

4.2.7.b. Padronização da oxidação do TNB pelo HOCl: Para o ensaio de oxidação do TNB foi utilizada a concentração do reagente descrita por Ching *et al* (1993), sendo que 70 μ M de TNB foi incubado por 15 minutos em temperatura ambiente com concentrações crescentes de HOCl (0 – 40 μ M).

4.2.7.c. Ensaio de monitoramento da reatividade com a espécie reativa HOCl: 70 μ M de TNB foram incubados por 15 minutos em temperatura ambiente, na ausência e na presença de crescentes concentrações dos galatos com 25 μ M de HOCl. Os resultados foram comparados com um grupo controle, considerando-se este com 100% de TNB no meio de reação.

4.2.8. Obtenção dos lipossomos:

4.2.8.a Obtenção dos lipossomos pela técnica de hidratação de filme lipídico: Os lipossomos foram obtidos pelo método de extrusão. Em um balão de vidro, 50mg de fosfatidilcolina de soja foram dissolvidos em 1mL de clorofórmio, removido em seguida sob gás nitrogênio formando um filme lipídico na parede do vidro. Posteriormente, o sistema foi deixado sob vácuo por 1h para a completa evaporação do solvente orgânico. O filme formado foi, então, re-hidratado com tampão de diálise diluído (Tricina 1mM, Cloreto de magnésio 0,25 mM, pH 8.0) e agitado vigorosamente em um agitador tipo vortex para o desprendimento do filme lipídico da parede do vidro e formação dos lipossomos em solução (HOPE *et al.*, 1986; WILSCHUT; HOEKSTRA, 1986).

4.2.8.b Obtenção dos lipossomos pelo método de diálise: Os lipídios foram previamente solubilizados em um tampão contendo 10 mM de tricina, 45 mM de colato de sódio e 25 mM de desoxicolato de sódio, pH 8.0. A diálise foi efetuada a 30 °C, utilizando-se uma membrana com poros de aproximadamente 2 nm, contra um volume de dois litros de tampão, constituído de 10 mM de tricina e 2,5 mM de cloreto de magnésio ($MgCl_2$), pH 8.0 (SONE *et al.*, 1977; CRECZYNSKI-PASA; GRÄBER, 1994).

4.2.9. Síntese de radical ascorbil :

O radical ascorbil foi produzido através da reação entre 0,025 mM de FeSO_4 e 0,50 mM de ácido ascórbico no meio de reação (CASALINO *et al.*, 1996; TEIXEIRA *et al.*, 2003).

4.2.10. Síntese de peroxinitrito:

O peroxinitrito foi sintetizado pelo método “quenched-flow”, proposto por Koppenol *et al.* (1996). Um sistema a vácuo utilizando-se frascos tipo Erlenmeyers, conectados por um T de vidro, foi utilizado para misturar soluções de 0,6 M de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em 0,7 M de ácido clorídrico (HCl), 0,6 M de nitrito de sódio (NaNO_2), e 1,5 M de hidróxido de sódio (NaOH), previamente resfriadas a 0°C . Durante a síntese, todas as soluções foram mantidas em banho de gelo e o produto final foi coletado após descarte dos primeiros mililitros em um frasco de Kitasato (de forma a estabelecer o fluxo de mistura das soluções), conforme demonstrado na figura 20, e armazenado a -70°C (em no máximo 7 dias) até sua utilização nos experimentos.

A concentração do peroxinitrito obtido foi determinada através de medidas espectrofotometricamente a 302 nm (coeficiente de extinção molar, $\varepsilon = 1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (RADI *et al.*, 1991).

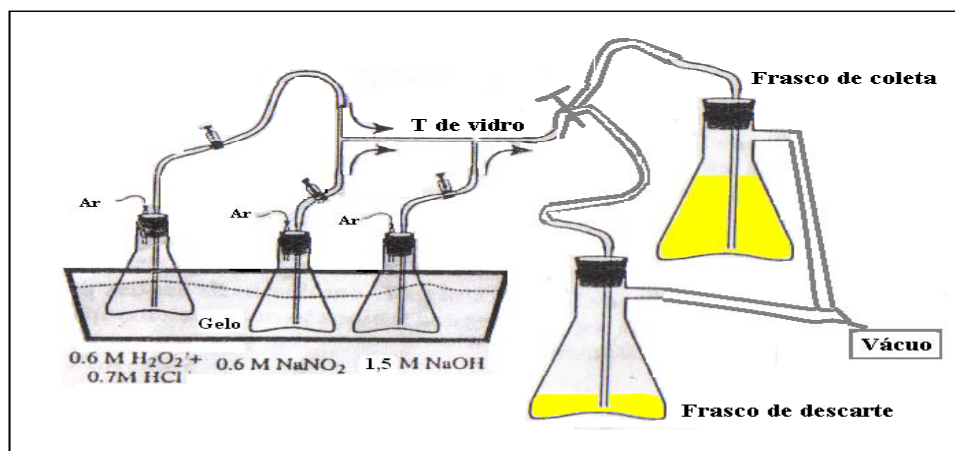


Figura 20: Demonstração esquemática da síntese de peroxinitrito (KOPPENOL *et al.*, 1996).

4.2.11. Lipoperoxidação induzida por espécies reativas:

A lipoperoxidação foi induzida pelo radical ascorbil (conforme descrito acima) ou pela espécie reativa peroxinitrito (2,64mM), através da geração ou adição destas espécies em um meio reacional contendo lipossomos (12,5 mg/mL de fosfolipídios) e 10 mM de tampão Tris-HCl, pH 7,4, na ausência e ou na presença de crescentes concentrações dos compostos em estudo.

As amostras e os controles foram incubados durante 30 minutos a 37°C e a extensão do dano lipoperoxidativo nas membranas foi avaliado através da detecção de espécies que reagem com o ácido tiobarbitúrico. Este método caracteriza-se pela formação de um aduto de coloração rósea a partir da reação entre malonildialdeído (MDA), produto majoritário da lipoperoxidação, e ácido tiobarbitúrico (TBA) em pH ácido, propiciado pela adição de ácido tricloroacético no meio (figura 21). Desta forma, quanto maior foi a leitura espectrofotométrica a 535 nm, maior foi a extensão do dano lipoperoxidativo. Assim, foi realizada uma análise de correlação linear em comparação com o grupo controle (ausência de compostos), para a determinação das IC₅₀ (concentração dos compostos necessária para inibir 50% do dano lipoperoxidativo). A concentração de TBARS foi calculada pela utilização do coeficiente de extinção molar (ϵ) de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em 535 nm (OHKAWA *et Al.*, 1979; BIRD; DRAPER, 1984; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000).

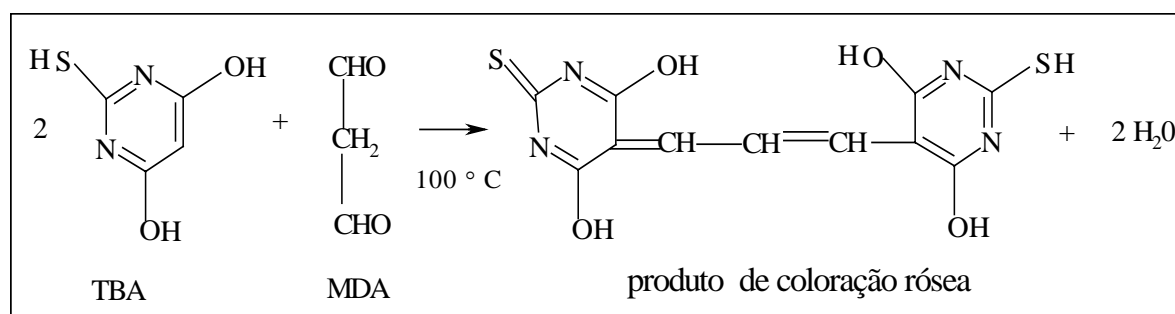


Figura 21: Reação entre ácido tiobarbitúrico (TBA) e malonildialdeído (MDA) para formar um aduto de coloração rósea

4.2.12. Determinação do coeficiente de extinção molar (ϵ)

O coeficiente de extinção molar dos galatos foi obtido através da equação de Lambert-Beer ($A = C \cdot \epsilon \cdot b$). Primeiramente, realizou-se uma varredura UV-visível em espectrofotômetro, nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 μM para determinar-se o comprimento de onda (λ) máximo de absorção dos compostos. Posteriormente, realizou-se a leitura da absorbância dos compostos em triplicatas, nas diferentes concentrações, obtendo-se o ϵ através da média destes experimentos.

4.2.13. Ensaio de incorporação dos galatos nos lipossomos

Os compostos foram incorporados durante a formação dos lipossomos. O procedimento de obtenção dos lipossomos foi realizado conforme anteriormente. Para o caso do método de extrusão, os galatos foram adicionados na etapa de re-hidratação, e, pelo método de diálise os galatos foram adicionados na solução de fosfolípidios submetida à diálise.

4.2.14. Determinação da concentração incorporada dos compostos em estudo nos lipossomos

As suspensões de lipossomos foram lavadas três vezes com tampão de diálise para a retirada do excesso de composto não incorporado, com posterior ressuspensão do precipitado em 1 mL de uma solução de Triton 0,15% para o rompimento das vesículas lipídicas e liberação dos compostos incorporados. As concentrações foram determinadas espectrofotometricamente utilizando-se o ϵ de cada composto.

4.2.15. Ensaio de lipoperoxidação nos lipossomos com os compostos incorporados

As soluções de lipossomos foram lavadas três vezes com tampão de diálise para retirar o excesso dos composto não incorporados. Posteriormente, os lipossomos foram ressuspensos no mesmo tampão e a peroxidação lipídica e a análise do dano lipoperoxidativo foram realizados conforme descrito anteriormente (em 4.2.11).

4.3. Análise dos resultados

Os resultados demonstrados neste trabalho forma expressos pela média \pm desvio padrão de triplicatas de experimentos independentes. Com os resultados obtidos, foram realizadas análises de correlação linear com o grupo controle (ausência de compostos) para a obtenção das IC_{50} de cada ensaio. Quando necessário, foi utilizado o teste estatístico t de Student.

5. Resultados e discussão

Um antioxidante, como dito anteriormente, pode ser definido como uma substância que, em baixas concentrações, seja capaz de retardar ou inibir significativamente a oxidação de um substrato. Entretanto, há muita controvérsia no que diz respeito à caracterização da atividade antioxidante de uma molécula através de ensaios *in vitro*. Isto ocorre devido ao não conhecimento da farmacocinética da molécula, como a sua absorção, metabolização e excreção, bem como a dúvida quanto a sua biodisponibilidade e efeitos *in vivo*. Um estudo realizado nos Estados Unidos (EUA), em 2004, demonstrou que o consumo de maçãs, que é o responsável pela ingestão de cerca de 22% de fenóis consumidos percapita nos EUA, não ocasionou um aumento substancial na proteção antioxidante do plasma de indivíduos saudáveis. Neste estudo foi observado que os extratos daquelas maçãs possuíam atividade antioxidante *in vitro*, mas que o consumo da fruta não tornou este resultado reproduzível substancialmente *in vivo* (LOTITO; FREI, 2004). Entretanto, outros estudos demonstraram que há uma correlação entre o aumento do conteúdo de flavonóides na dieta e a redução do risco de aterosclerose, isquemia e infarto do miocárdio (HERTOG *et al.*, 1993). Além disso, pesquisadores em todo o mundo relatam a importância biológica de compostos fenólicos, como os carotenóides, na prevenção de processos patológicos associados a fotooxidação (STAHL; SIES, 2005), e os tocoferóis, na redução e ou prevenção da oxidação da LDL no processo aterosclerótico (KNOTT *et al.*, 2002; BOTTI *et al.*, 2004).

Nem sempre uma atividade biológica descrita *in vitro* será totalmente reproduzível *in vivo*. Entretanto, a atribuição da capacidade antioxidante de uma determinada substância *in vitro* adquire importância como uma propriedade adicional desta molécula em um sistema mais complexo, como é o caso do retinol, da melatonina e dos estrogênios, entre outros (AZZI *et al.*, 2004).

Em um trabalho publicado recentemente, do qual nosso grupo participou, Savi *et al.* (2005) demonstraram a capacidade do ácido gálico e destes mesmos derivados n-alquil-ésteres de reagirem com o radical difenil picril hidrazil (DPPH) e de protegerem a lipoperoxidação em microssomas de fígados de ratos induzida pelo radical ascorbil. As EC₅₀ para DPPH (concentração dos compostos que

seqüestraram 50% do radical DPPH) e as IC_{50} para a proteção da lipoperoxidação induzida pelo radical ascorbil (concentração dos compostos necessária para inibir 50% da lipoperoxidação em microsomas de fígado de ratos induzida pelo radical ascorbil) variaram entre 15 e 35 μM , e, 25 e 65 μM , respectivamente (Figuras 22 e 23).

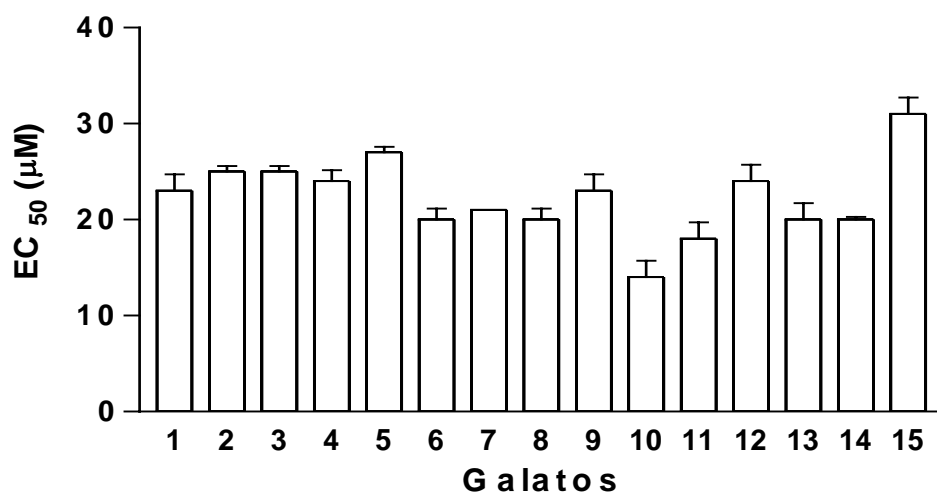


Figura 22: Valores das EC_{50} dos galatos para a reatividade com o radical DPPH (SAVI *et al.* 2005).

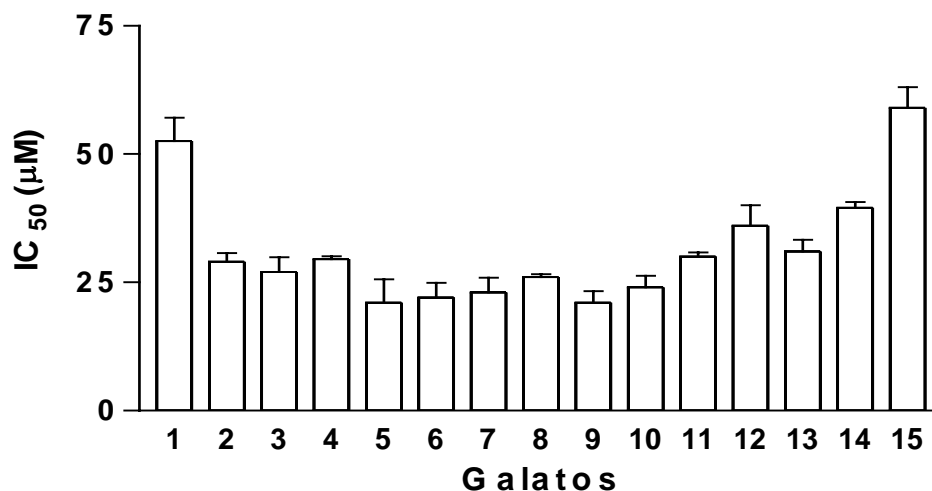


Figura 23: Valores das IC₅₀ dos galatos para proteção da lipoperoxidação em microsomas de fígados de ratos induzida por ascorbil (SAVI *et al.*, 2005).

Desta forma, ficou caracterizado o efeito antioxidante dos galatos de neutralizar um radical livre, através do ensaio de reatividade com o DPPH, e de proteger a peroxidação lipídica em microsomas de fígado de ratos induzida pelo radical ascorbil. Além disso, foi demonstrado que esta é uma atividade considerável, pois a intensidade desses efeitos foi comparável à da quercetina, realizado no laboratório (EC₅₀ da quercetina para DPPH = 17 µM; IC₅₀ da quercetina para inibição da lipoperoxidação = 28 µM). Assim, Savi *et al.* (2005), concluíram que o ácido gálico e seus n-alquil-ésteres derivados sintéticos possuem uma potencial atividade antioxidante *in vitro*. Nesta dissertação está sendo relatada uma abordagem mais abrangente sobre a atividade antioxidante *in vitro* dos galatos, como a capacidade de seqüestrar outras espécies reativas e de atuar contra a lipoperoxidação em diferentes modelos de lipossomos; a ação sobre uma enzima pró-oxidante, a mieloperoxidase; a citotoxicidade em tecido hepático de ratos; e uma análise da relação entre a atividade biológica e a lipofilicidade.

5.1. Estudo da capacidade do ácido gálico e dos galatos de inibir a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).

A preparação da MPO foi adicionada ao meio de reação, contendo um doador de Cl^- (θ -dianisidina-2-HCl) e H_2O_2 promovendo a formação de HOCl , que por sua vez oxidou a θ -dianisidina em um produto que foi monitorado pela sua absorção em 450 nm.

Primeiramente foi realizada uma leitura da absorbância do produto oxidado em função do tempo. Adicionando-se concentrações crescentes dos compostos em estudo no meio de reação. Desta forma, foi obtido um gráfico referente à cinética da oxidação da θ -dianisidina em função do tempo avaliando-se também a influência da adição de crescentes concentrações dos galatos. Na Figura 24 está demonstrado o efeito do ácido gálico na atividade da MPO.

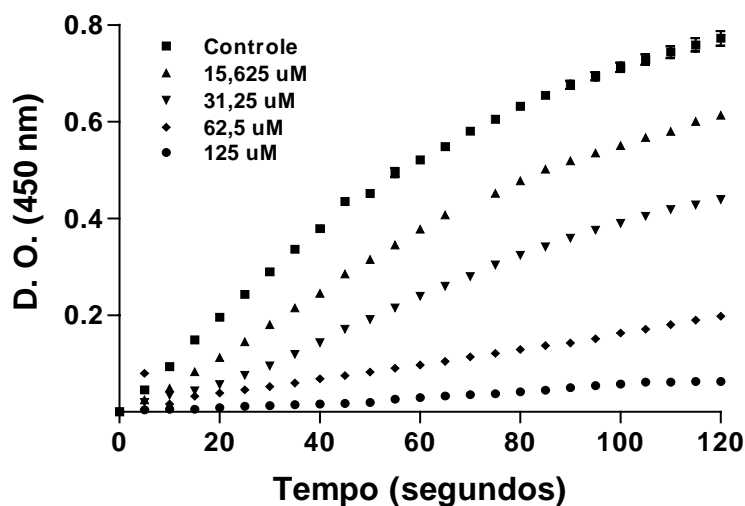


Figura 24: Curvas de oxidação da θ -dianisidina pelo produto da atividade da mieloperoxidase em função do tempo na ausência e na presença de crescentes concentrações de ácido gálico, conforme as legendas mostradas no gráfico.

O efeito do ácido gálico sobre a atividade da enzima foi avaliado através do cálculo das tangentes das curvas da Figura 24 e está representado na Figura 25.

Como se trata de um elevado número de substâncias químicas, estão demonstrados apenas as análises realizadas com o ácido gálico (Figuras 24 e 25), e com o galato de butila (Figura 26), que foi o composto mais ativo para a inibição da mieloperoxidase. Ressalta-se, no entanto, que estas análises também foram realizadas com os demais derivados n-alquil-ésteres já mencionados.

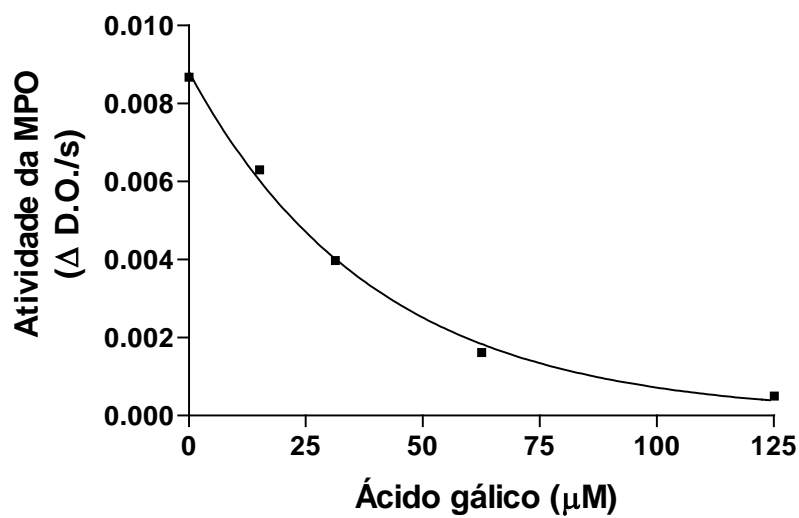


Figura 25: Ação do ácido gálico na atividade da MPO. A atividade da enzima foi calculada pela tangente das curvas da Figura 24.

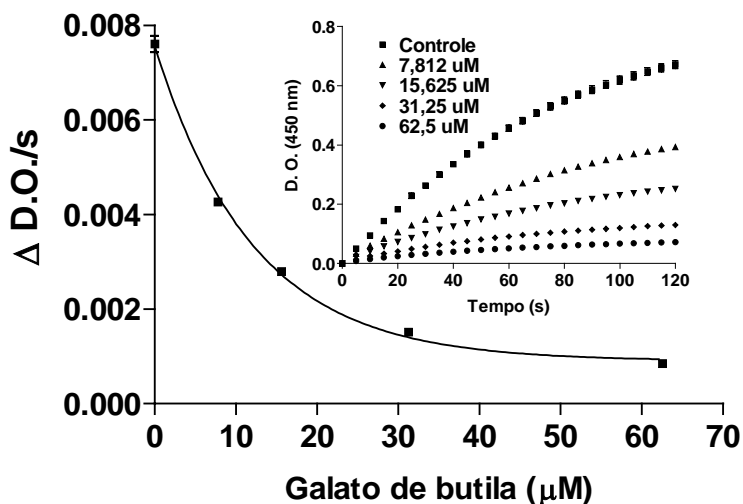


Figura 26: Efeito do galato de butila na atividade da MPO.

Após a obtenção das tangentes das curvas de oxidação da θ -dianisidina, foram realizadas análises em comparação com o grupo controle (ausência de compostos) para a obtenção das constantes de inibição ($K_{0,5}$) da MPO, o que significa a concentração do inibidor necessária para reduzir em 50% a atividade da enzima. A Figura 27 e a Tabela 5 mostram os valores das $K_{0,5}$ de todos os compostos.

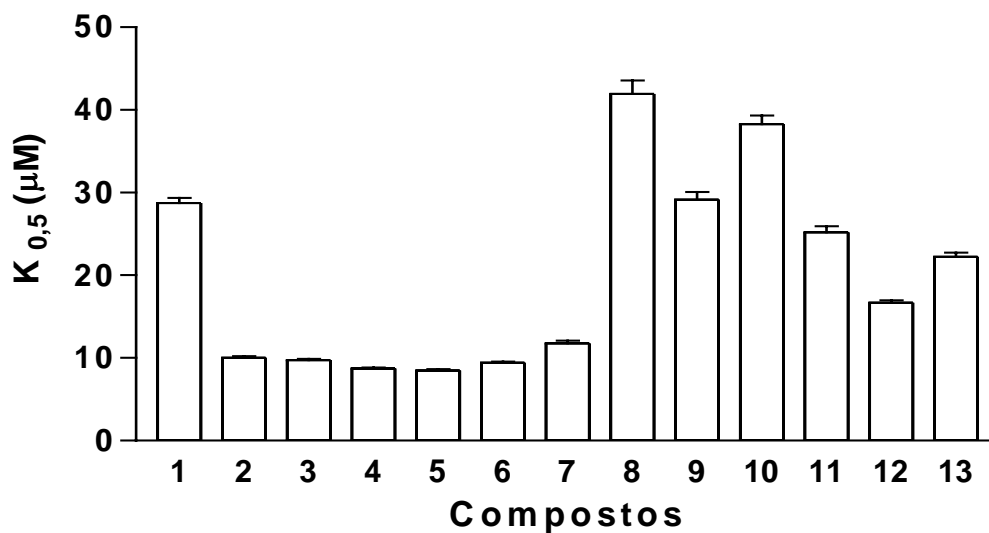


Figura 27: Valores das $K_{0,5}$ dos galatos em estudo neste trabalho para a inibição da atividade da mieloperoxidase.

Tabela 5: Valores das $K_{0,5}$ dos galatos em estudo para a inibição da atividade da mieloperoxidase.

Composto	$K_{0,5}$	Composto	$K_{0,5}$
1- Ácido Gálico	$28,7 \pm 1,1$	9- Galato de octila	$29,1 \pm 1,6$
2- Galato de metila	$10,0 \pm 0,4$	10- Galato de decila	$38,2 \pm 1,8$
3- Galato de etila	$9,7 \pm 0,3$	11- Galato de undecila	$25,2 \pm 1,3$
4- Galato de propila	$8,7 \pm 0,2$	12- Galato de dodecila	$16,7 \pm 0,5$
5- Galato de butila	$8,5 \pm 0,3$	13- Galato de tetradecila	$22,2 \pm 0,9$
6- Galato de pentila	$9,4 \pm 0,2$	14- Galato de hexadecila	*
7- Galato de hexila	$11,8 \pm 0,6$	15- Galato de octadecila	*
8- Galato de heptila	$41,9 \pm 2,2$		

* não inibiram a enzima.

A MPO catalisa a formação do HOCl a partir de H_2O_2 e Cl^- . O HOCl é uma espécie oxidante envolvida em muitos processos patológicos, pois provoca a oxidação direta de proteínas e lipídios. A função desta enzima é bastante relevante, pois no "burst respiratório" de fagócitos, o HOCl formado desempenha uma importante função na destruição de células bacterianas (DAVIES *et al.*, 1993, WINTERBOURN, 2002). Além deste efeito fisiológico, o HOCl formado pela MPO também está envolvido na oxidação de lipídios e proteínas em processos patológicos como na aterosclerose, na fibrose cística (STAMBRO, 1998), na artrite reumatóide e na doença inflamatória intestinal, entre outros (HALLIWELL *et al.*, 1987; THOMAS; KALYANARAMAN, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000).

Os resultados mostram que o ácido gálico e seus derivados n-alquil-ésteres são capazes de inibir a oxidação da θ -dianisidina pelo produto da atividade da MPO. Entretanto, os compostos 14 e 15 não inibiram a atividade da MPO. Kroes *et al.* (1992), descrevem que o ácido gálico inibe a atividade da MPO de polimorfonucleares *in vitro*, citando que a presença do grupamento θ -dihidroxi é o principal responsável por esta atividade. Em um meio de reação contendo MPO/ H_2O_2 /L-tirosina, Kato *et al.* (2003) também demonstraram este efeito para o

ácido gálico. Eles monitoraram a formação de ditirosina, um produto da oxidação da L-tirosina, para avaliar a atividade enzimática.

Os resultados obtidos neste trabalho convergem com os dados da literatura, entretanto, pode haver uma ambigüidade nas interpretações. Os galatos podem estar atuando tanto como inibidores da MPO como seqüestradores de espécies reativas, particularmente o HOCl. Deste modo, com o propósito de elucidar a interpretação destes resultados, está demonstrada a seguir a avaliação da reatividade dos galatos com o HOCl.

5.2. Estudo da capacidade do ácido gálico e dos galatos de seqüestrar ácido hipocloroso pela técnica da oxidação do TNB.

O TNB é um ácido que possui um máximo de absorção em 412 nm. A sua absorção diminui através da sua oxidação pelo HOCl à DTNB, cuja absorção máxima ocorre em 325 nm (CHING *et al.*, 1994). A Figura 28 demonstra a curva de calibração construída a partir dos resultados da oxidação de 70 μ M de TNB em função da concentração de HOCl.

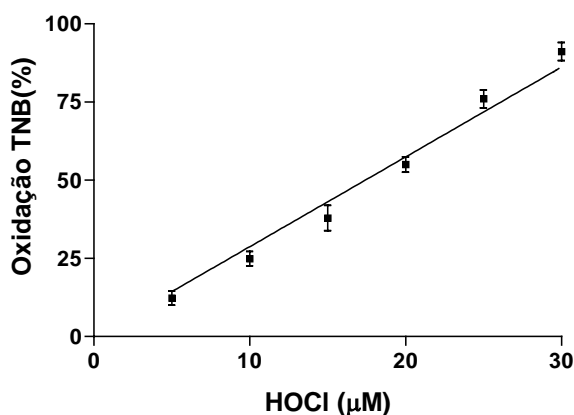
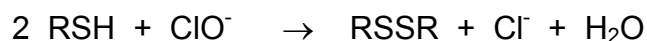
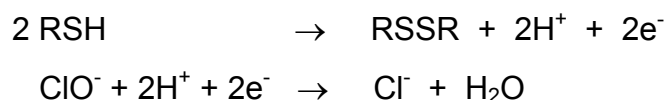


Figura 28: Curva padrão de oxidação do TNB pelo HOCl.

Os resultados estão expressos em % de oxidação ($r^2=0,9935$).

A reação entre TNB e HOCl possui estequiometria 2:1 (WINTERBOURN, 1985; CHING *et al.*, 1994), e está demonstrada na Equação 18. O ensaio de oxidação do TNB é uma ferramenta reprodutível para o estudo da capacidade seqüestradora de HOCl e é utilizada por vários autores (CHING *et al.*, 1994, VALENTÃO *et al.*, 2002).



Equação 18

A partir dos dados da curva de oxidação, os experimentos foram padronizados com 70 μM de TNB, para atuar em uma faixa linear de absorbância, e 25 μM de HOCl, para obter uma oxidação de aproximadamente 75 % de TNB presente no meio.

Na Figura 29 estão demonstrados os resultados de inibição da oxidação do TNB pelos compostos 1 (ácido gálico), 8 (galato de heptila), 9 (galato de octila) e 14 (galato de hexadecila). Os gráficos desta figura representam uma análise de comparação com o grupo controle (ausência de antioxidante). Ressalta-se desta forma, que estas análises foram realizadas com todos os compostos em estudo neste trabalho.

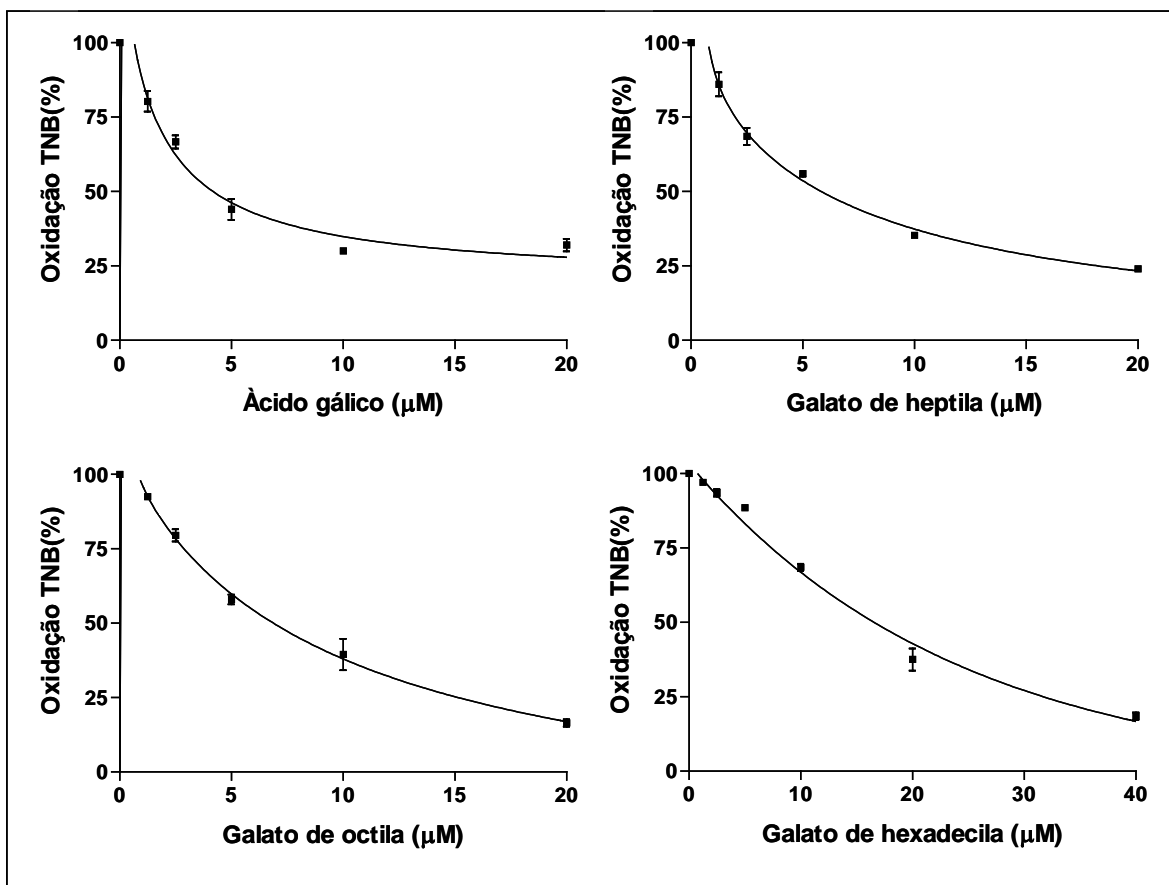


Figura 29: Proteção da oxidação do TNB pela adição de crescentes concentrações dos compostos 1 (ácido gálico), 8 (galato de heptila), 9 (galato de octila) e 14 (galato de hexadecila) em comparação com o grupo controle (ausência de antioxidante).

Juntamente com esta análise, foi realizada a determinação da porcentagem de TNB remanescente no meio de reação para monitorar o ensaio (Figura 30).

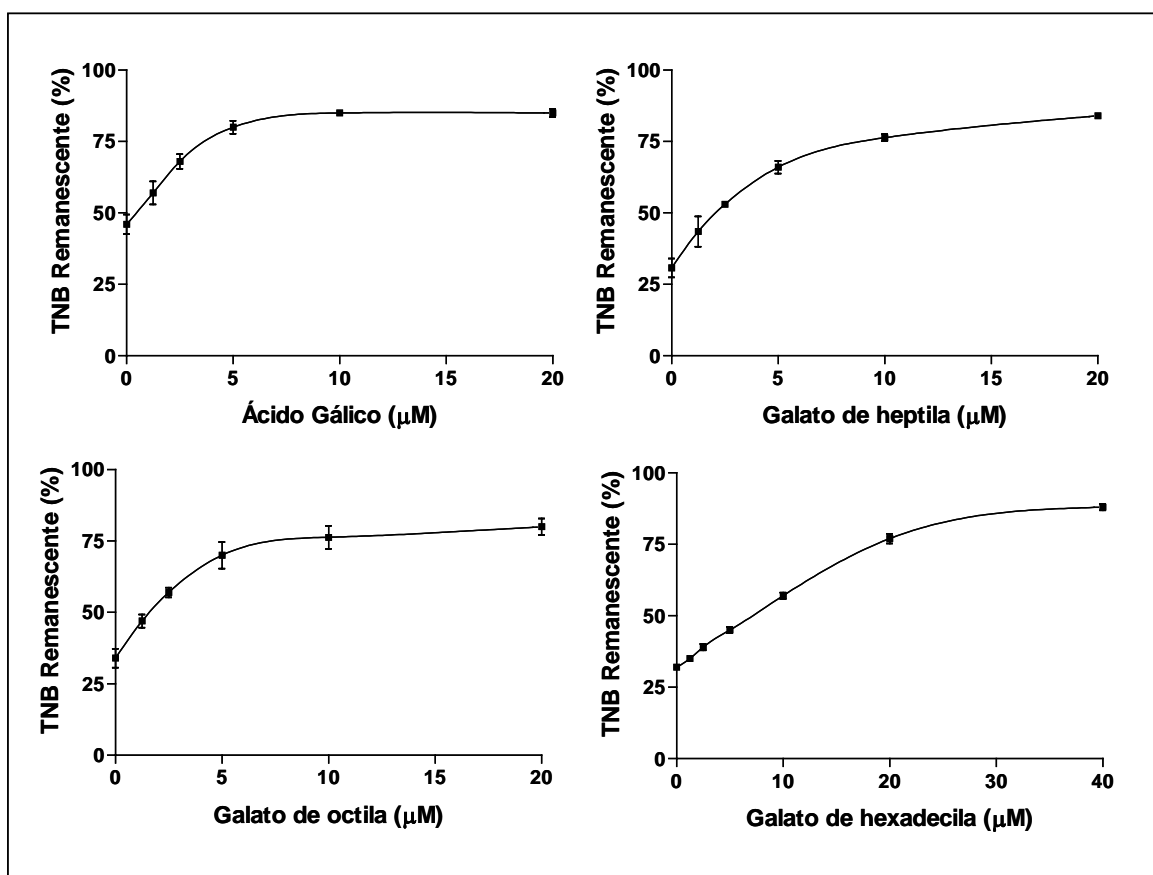


Figura 30: Determinação da porcentagem de TNB remanescente no meio de reação.

Através da análise de correlação do ácido gálico e dos seus n-alquil-ésteres derivados sintéticos em comparação com o grupo controle (conforme demonstrado na Figura 30) foi possível obter os resultados das IC_{50} (concentração necessária para inibir 50% da oxidação de 70 μM de TNB por 25 μM de HOCl) que estão demonstrados na Figura 31 e na Tabela 6.

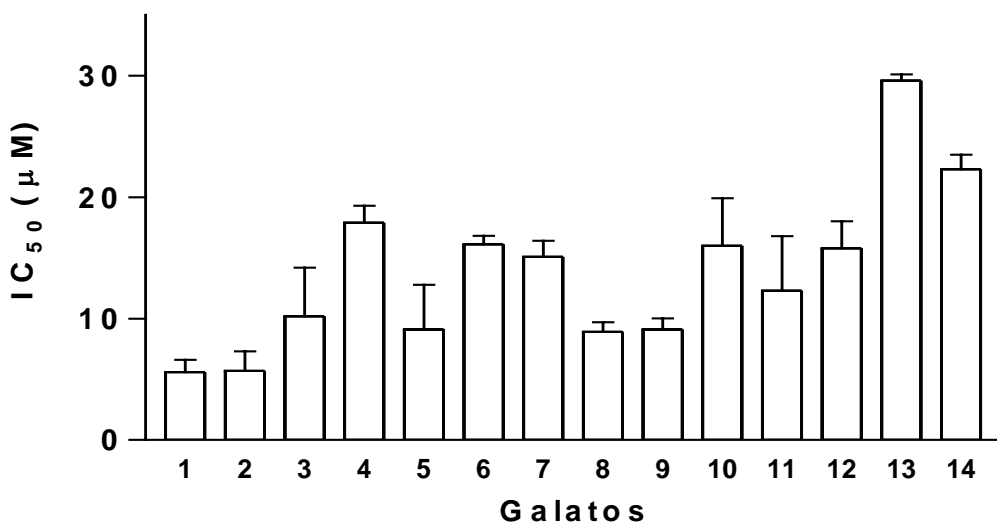


Figura 31: Valores das IC₅₀ do ácido gálico (1) e dos galatos (2-14) para a inibição da oxidação de 70 μM de TNB por 25 μM de HOCl. Resultados apresentados em média ± desvio padrão (n=3).

Tabela 6: Valores das IC₅₀ do ácido gálico e dos galatos para a inibição da oxidação de 70 μM de TNB por 25 μM de HOCl.

Composto	IC ₅₀	Composto	IC ₅₀
1- Ácido Gálico	5,6 ± 1,0	9- Galato de octila	9,1 ± 0,9
2- Galato de metila	5,7 ± 1,6	10- Galato de decila	16 ± 0,7
3- Galato de etila	10,2 ± 4,0	11- Galato de undecila	12,3 ± 1,3
4- Galato de propila	17,9 ± 1,4	12- Galato de dodecila	15,8 ± 2,2
5- Galato de butila	9,1 ± 3,7	13- Galato de tetradecila	29,6 ± 0,5
6- Galato de pentila	16,1 ± 0,7	14- Galato de hexadecila	22,3 ± 1,2
7- Galato de hexila	15,1 ± 1,3	15- Galato de octadecila	Nd
8- Galato de heptila	8,9 ± 0,8		

* Nota: Resultados das IC₅₀ apresentados em média ± desvio padrão (n=3).

nd= não determinado, o composto promoveu a turvação do meio de reação.

Com base nestes resultados, podemos afirmar que os galatos atuam como seqüestradores de HOCl. Esta atividade pode ser atribuída principalmente aos grupamentos –OH presentes nestas moléculas. Conforme discutido por Yan *et al* (1996), os grupamentos –OH são os responsáveis pela atividade seqüestradora do HOCl pelo α -tocoferol e ácido ascórbico. Os mesmos autores citam ainda que grupamentos –SH também são efetivos para este efeito, mas que interferem nesta metodologia por reduzirem o DTNB à TNB. Além desses grupamentos, a presença de duplas ligações entre carbonos também pode intensificar esta atividade, visto que o HOCl forma adutos α,β -clorohidrinas nas insaturações de ácidos graxos (ZAVODNIK *et al.*, 2002). Em um ensaio paralelo, em que foi testada a reatividade do ácido θ , m, ρ -trimetóxi-benzóico, que em vez das hidroxilas possui três grupamentos metóxi (-OCH₃), não foi observada a inibição da oxidação do TNB pelo HOCl (resultados não apresetnados).

Ao mesmo tempo em que há citações sobre a reatividade de compostos fenólicos (ARUOMA *et al.*, 1992; SAKAGAMI *et al.*, 1995), de flavonóides (FIRUZI *et al.*, 2004; SELLOUM *et al.*, 2004), e de carotenóides (PANASENKO *et al.*, 1997) com o HOCl, não foram encontradas, até o momento, evidências na literatura sobre esta atividade do ácido gálico ou por algum destes seus derivados. A maioria desses autores cita que a presença de grupamentos hidroxila é a principal responsável por esta atividade e que insaturações presentes na molécula também podem contribuir com este efeito. Mesmo assim, o mecanismo de reação destes compostos com o HOCl ainda requer maiores investigações.

5.3. Estudo da capacidade do ácido gálico e dos galatos de seqüestrar óxido nítrico.

O ensaio de reatividade com o radical NO^\bullet foi realizado através da liberação desta molécula em um meio tamponado na ausência e na presença dos compostos em estudo. O nitroprussiato de sódio (NaNPS) foi utilizado como um doador químico de NO^\bullet , cuja liberação foi monitorada através da detecção de íons nitrito formados no meio, pela reação do NO^\bullet com O_2 pela técnica de Griess (GREEN *et al.*, 1982). A concentração de íons nitrito formados no meio, que foi proporcional a liberação de NO^\bullet , foi calculada empregando-se uma curva padrão (Figura 32), obtida após a incubação de diferentes concentrações de nitrito (nitrito de sódio) com o reagente de Griess.

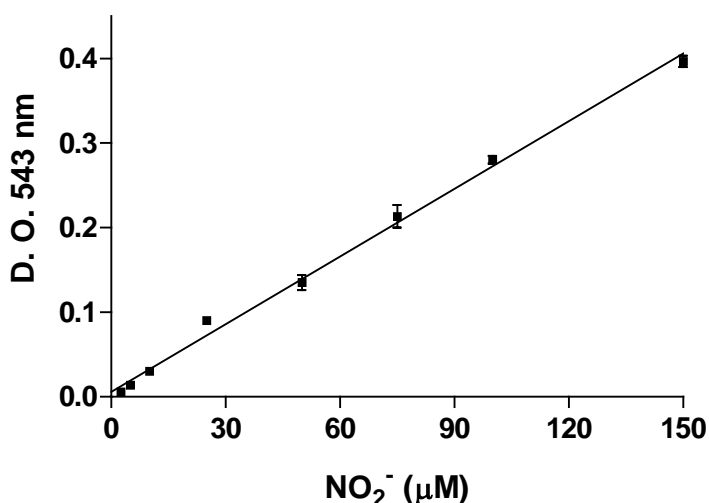


Figura 32: Curva padrão de nitritos ($r^2=0,9915$).

O NaNPS é utilizado em diversos estudos como doador de NO^\bullet . Sanches *et al.* (2001) evidenciaram que o NO^\bullet liberado do NaNPS induziu a liberação de L-DOPA no tecido estriatal de ratos. Em um outro estudo, Kong *et al.* (1994) comprovaram que o NO^\bullet , gerado a partir do NaNPS, ocasionou um aumento na concentração citosólica de cálcio livre. Nakagawa e Yokozawa (2002) também

utilizaram o NaNPS como doador químico de NO[•] para estudar a reatividade de extratos de chás verdes com esta molécula. Além disso, demonstraram que os componentes polifenólicos presentes nestes extratos são os principais responsáveis por esta atividade. Entretanto, o ácido gálico e os galatos não tiveram reatividade com o NO[•] nas concentrações até 200 µM (Figura 33). Como também se tratam de compostos polifenólicos, estes resultados estão em contraposição com o descrito por Nakagawa e Yokozawa (2002), e com Acker *et al.* (1995) que descreveram a reatividade de flavonóides, como a rutina, que possui um grupamento glicosídeo, com o NO[•]. Deste modo, pode-se sugerir que há outros fatores responsáveis pela reatividade de polifenólicos, como a rutina, com o NO[•] além da presença de substituintes hidroxilas.

Estudos têm demonstrado que estruturas com centros metálicos apresentam reatividade com NO[•]. Proteínas como a mioglobina e a neuroglobina, que possuem centros heme-metálicos, atuam como reguladores fisiológicos locais desta molécula (BURMESTER *et al.*, 2000; ASCENZI E BRUNORI, 2001).

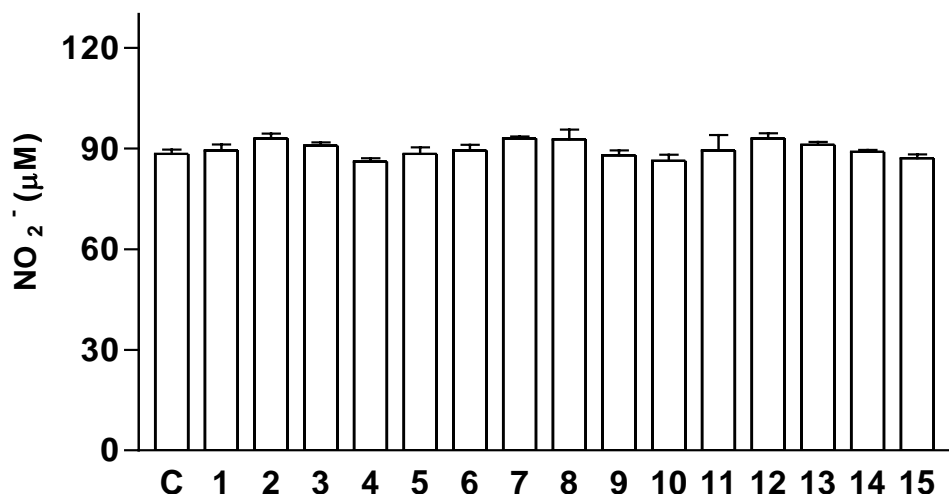


Figura 33: Determinação da concentração de nitritos, na ausência (grupo controle) e na presença de até 200 µM de ácido gálico (1) ou dos galatos (2-15), oriundos da reação entre o NO[•] liberado do NaNPS e o oxigênio. Os resultados estão demonstrados em média ± desvio padrão e o grupo controle está representado pela letra C (n=3).

O NO[•] é uma molécula mensageira que exerce diversas funções nos sistemas biológicos. Atua como vasodilatador, modulador da resposta inflamatória e na neurotransmissão, tanto do sistema nervoso central como do periférico (ANDOH *et al.*, 2002; LEONG *et al.*, 2002). Entretanto, quando gerado em altas concentrações, ele pode desencadear uma cascata de reações, resultando na geração de espécies reativas, que podem causar danos neuronais progressivos e consequentemente a apoptose neuronal (KISS *et al.*, 2000). No entanto, os efeitos citotóxicos mais intensos oriundos da superprodução de NO[•] tem sido atribuídos ao ONOO⁻, que, conforme mencionado anteriormente, é formado a partir da reação entre o NO[•] e o O₂^{•-} (RADI *et al.*, 1991a; RADI *et al.*, 1991b). Deste modo, como o ácido gálico e os galatos não apresentaram reatividade com o NO[•] nas concentrações de até 200 µM, avaliamos a capacidade destes compostos em proteger membranas lipídicas da ação de espécies reativas como o [•]Asc e o ONOO⁻, que é o principal metabólito tóxico do NO[•].

5.4. Estudo da capacidade do ácido gálico e dos galatos em proteger lipossomos de fosfatidilcolina da peroxidação lipídica

A composição lipídica e o estado físico das membranas celulares estão relacionadas com a conformação e com a atividade de enzimas e de receptores de membrana, bem como com a organização estrutural da célula. Os lipídios constituintes das membranas podem ser modificados quimicamente por espécies reativas, alterando, assim, as suas funções e características. Essas alterações químicas dos lipídios comprometem a permeabilidade de membranas celulares ao cálcio, bem como ocasionam danos às proteínas e aos receptores, comprometendo a organização e o metabolismo celular (REITER, 1998; YIN *et al.*, 1998).

O uso de lipossomos como modelo de membrana para o estudo de lipoperoxidação é aceito e bem difundido na área (CASTELLI *et al.*, 1997;

TEIXEIRA *et al.*,2003; DE LIMA *et al.*, 2004). Além do conteúdo lipídico das membranas, as características intrínsecas do agente oxidante influencia na extensão da lipoperoxidação. De Lima *et al.* (2004) demonstraram que o $\cdot\text{Asc}$ ocasiona uma maior formação de espécies que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) em comparação com a espécie reativa ONOO^- em lipossomos de fosfatidilcolina.

No presente trabalho, lipossomos de fosfatidilcolina foram submetidos à peroxidação induzida por $\cdot\text{Asc}$ e por ONOO^- . Fisiologicamente, a geração do ONOO^- é bem estabelecida pela reação entre o $\text{NO}\cdot$ e o $\text{O}_2\cdot^-$. Depois de formada, esta molécula causa danos em macromoléculas, como já mencionado. Já a formação fisiológica do radical ascorbil ainda é discutível e requer maiores investigações. Pietri *et al.* (1994) demonstraram que a geração de $\cdot\text{Asc}$ acarreta dano tecidual em pacientes com isquemia cardíaca. Casalino *et al.* (1996), demonstraram que a formação do $\cdot\text{Asc}$ é responsável pela peroxidação de lipídios em microssomas de fígado de ratos *in vivo*. Estudos demonstram a formação do $\cdot\text{Asc}$ no ciclo redox do α -tocoferol na proteção das LDLs (LARANJINHA; CADENAS, 1999). Além disso, Courderot-Masuyer *et al.* (2000), relatam que a redução da capacidade antioxidante do plasma de indivíduos com diabetes tipo II é devido ao aumento da relação $\cdot\text{Asc}$ /ascorbato.

Deste modo, foi mostrado que o ácido gálico e os seus derivados n-alquil-ésteres sintéticos protegem a lipoperoxidação induzida por $\cdot\text{Asc}$ e por ONOO^- em lipossomos de fosfatidilcolina. A extensão do dano lipídico foi monitorada pela formação de TBARS. Desta forma, foram realizadas análises adicionando-se crescentes concentrações do ácido gálico e de seus derivados em comparação com o grupo controle (ausência de antioxidante). A Figura 34 demonstra as curvas concentração-resposta de inibição da lipoperoxidação induzida pelo radical $\cdot\text{Asc}$ dos compostos 1 (ácido gálico), 8 (galato de heptila), 9 (galato de octila) e 15 (galato de octadecila) com vista à avaliação da relação estrutura com a atividade destes compostos. Escolheu-se estes compostos para apresentar-se graficamente em função do Log P, abrangendo toda a faixa de lipofilicidade em estudo. Os

respectivos Log P são 0.89, 3.32, 3.72 e 7.68. Vale ressaltar, que estas análises foram realizadas com todos os galatos.

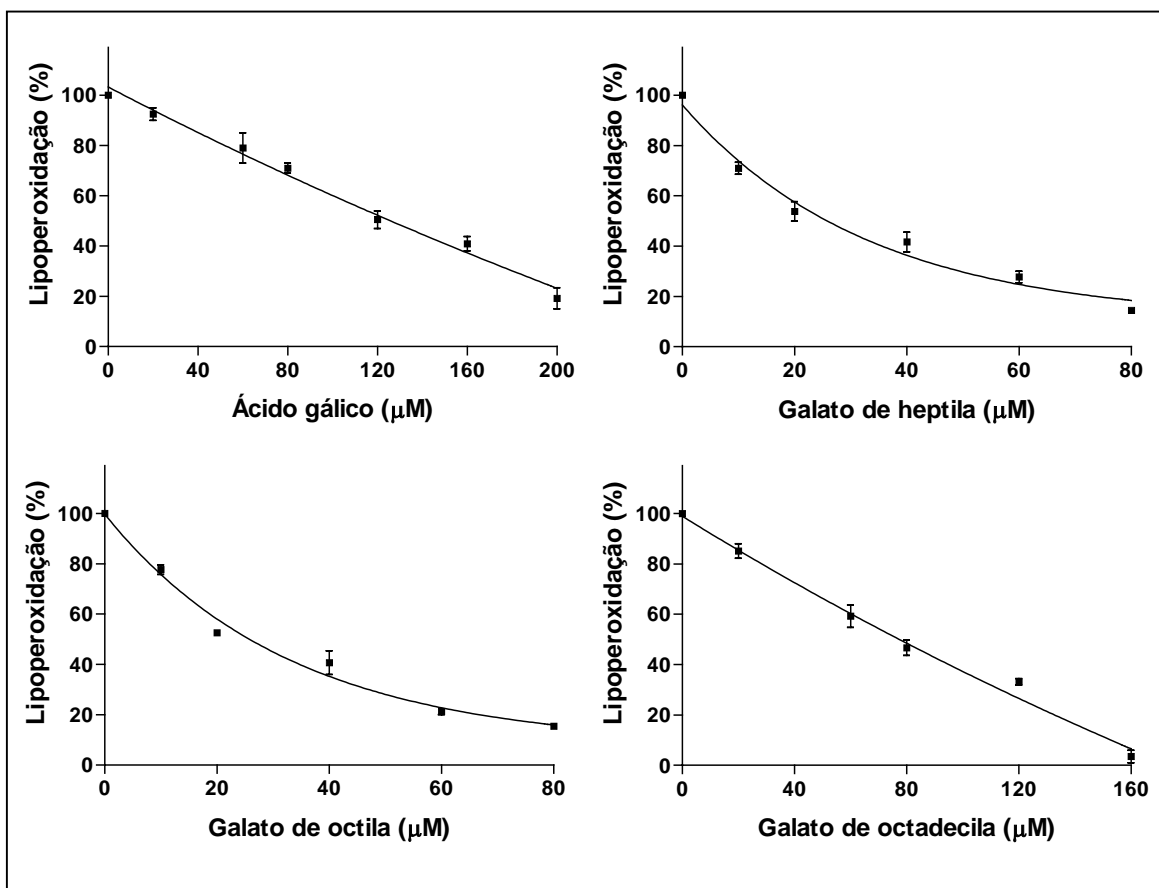


Figura 34: Ação dos compostos 1 (ácido gálico), 8 (galato de heptila), 9 (galato de octila) e 15 (galato de octadecila) contra a peroxidação lipídica em lipossomos de fosfatidilcolina induzida por $\cdot\text{Asc}$. Os resultados estão demonstrados em média \pm desvio padrão (n=3).

Do mesmo modo, na Figura 35 estão demonstradas as curvas concentração-resposta de inibição da lipoperoxidação induzida pelo ONOO^- dos compostos 1 (ácido gálico), 8 (galato de heptila), 9 (galato de octila) e 15 (galato de octadecila).

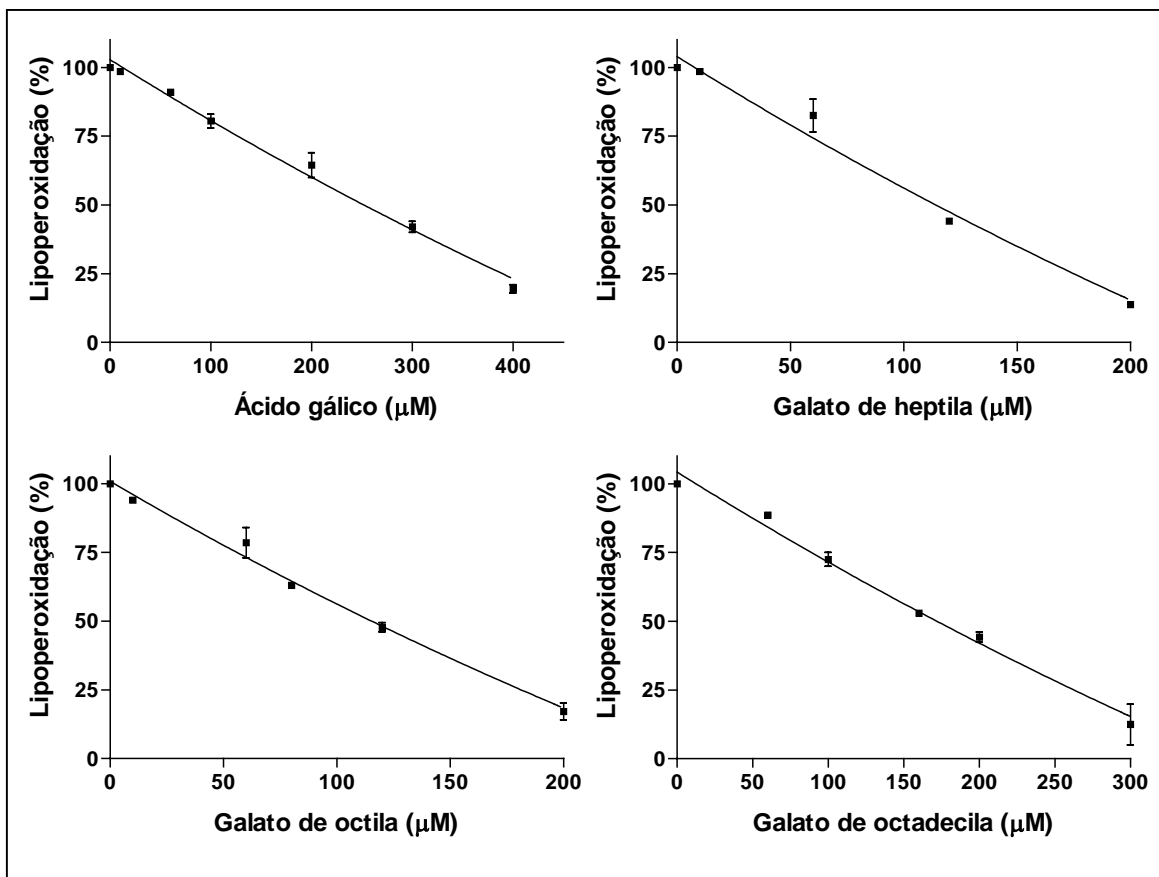


Figura 35: Ação dos compostos 1 (ácido gálico), 8 (galato de heptila), 9 (galato de octila) e 15 (galato de octadecila) contra a peroxidação lipídica em lipossomos de fosfatidilcolina induzida por ONOO^- . Os resultados estão demonstrados em média \pm desvio padrão ($n=3$).

Através destas análises, foi possível determinar as IC_{50} s para proteção contra a lipoperoxidação induzida por $^*\text{Asc}$, que estão demonstradas na Tabela 7 e na Figura 36, e por ONOO^- , que estão demonstradas na Tabela 8 e na Figura 37.

Tabela 7: Valores das IC₅₀s contra a lipoperoxidação induzida por [•]Asc do ácido gálico e dos galatos.

Composto	IC ₅₀	Composto	IC ₅₀
1- Ácido Gálico	140 ± 14	9- Galato de octila	25 ± 2
2- Galato de metila	42 ± 4	10- Galato de decila	34 ± 1
3- Galato de etila	71 ± 6	11- Galato de undecila	38 ± 5
4- Galato de propila	84 ± 2	12- Galato de dodecila	36 ± 6
5- Galato de butila	77 ± 4	13- Galato de tetradecila	89 ± 2
6- Galato de pentila	64 ± 1	14- Galato de hexadecila	80 ± 4
7- Galato de hexila	5 ± 1	15- Galato de octadecila	79 ± 6
8- Galato de heptila	22 ± 6		

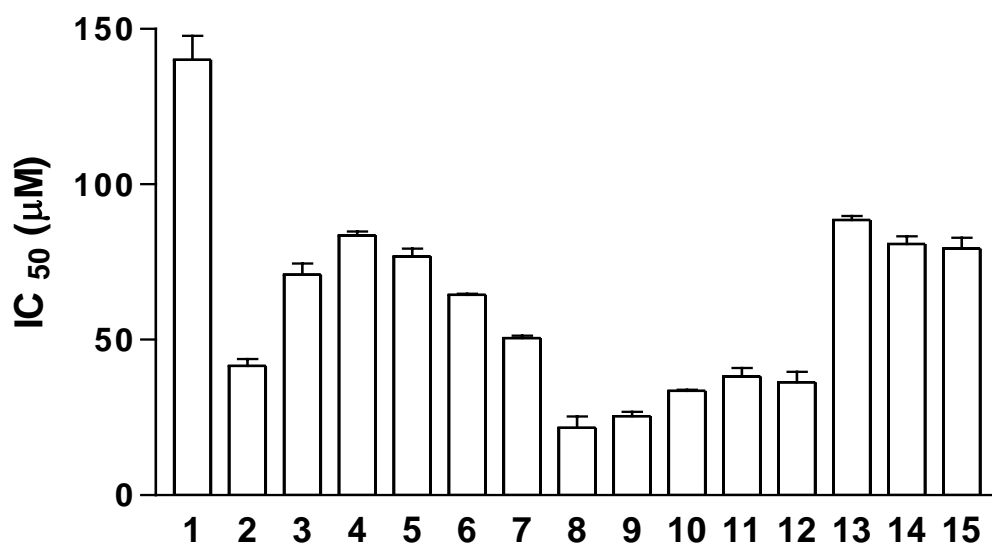


Figura 36: Valores das IC₅₀ para proteção da lipoperoxidação induzida por [•]Asc do ácido gálico (1) e dos galatos (2 – 15). Os resultados estão apresentados em média ± desvio padrão (n=3).

Tabela 8: Valores das IC_{50} contra a lipoperoxidação induzida por $ONOO^-$ do ácido gálico e dos galatos.

Composto	IC_{50}	Composto	IC_{50}
1- Ácido Gálico	283 ± 7	9- Galato de octila	132 ± 6
2- Galato de metila	192 ± 5	10- Galato de decila	124 ± 5
3- Galato de etila	230 ± 7	11- Galato de undecila	139 ± 7
4- Galato de propila	212 ± 8	12- Galato de dodecila	152 ± 6
5- Galato de butila	201 ± 9	13- Galato de tetradecila	188 ± 6
6- Galato de pentila	168 ± 6	14- Galato de hexadecila	177 ± 8
7- Galato de hexila	170 ± 3	15- Galato de octadecila	$226 \pm 5,0$
8- Galato de heptila	117 ± 4		

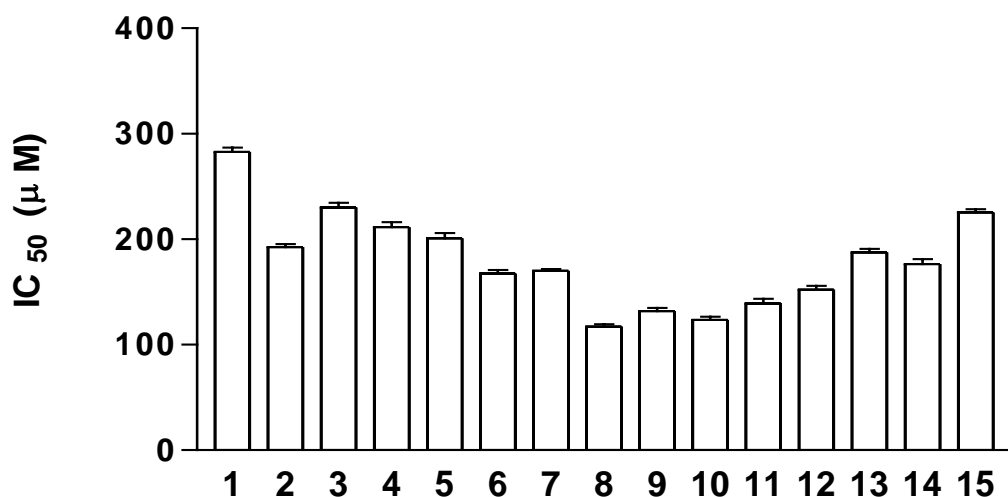


Figura 37: Valores das IC_{50} para proteção da lipoperoxidação induzida por $ONOO^-$ do ácido gálico (1) e dos galatos (2 – 15). Os resultados estão apresentados em média \pm desvio padrão (n=3).

Nas Figuras 36 e 37 podemos visualizar, de um modo geral, que os compostos 8, 9 e 10 apresentam menores IC_{50} s para a proteção da lipoperoxidação induzida por ambas espécies reativas. Além da utilização das IC_{50} s, realizamos uma avaliação da intensidade do efeito antioxidante através da determinação da tangente do ângulo de inclinação da curva concentração-resposta de proteção contra a lipoperoxidação (Tabela 9). Para o cálculo das tangentes, todos os gráficos foram normalizados na mesma escala, e o valor da tangente foi obtido na curva com 75% de lipoperoxidação. Na Figura 38, estão demonstrados graficamente os valores das tangentes dos compostos 1 e 15, porque possuem o menor e o maior valor de Log P, respectivamente, e dos compostos 8, 9 e 10, que de um modo geral, apresentaram as menores IC_{50} s.

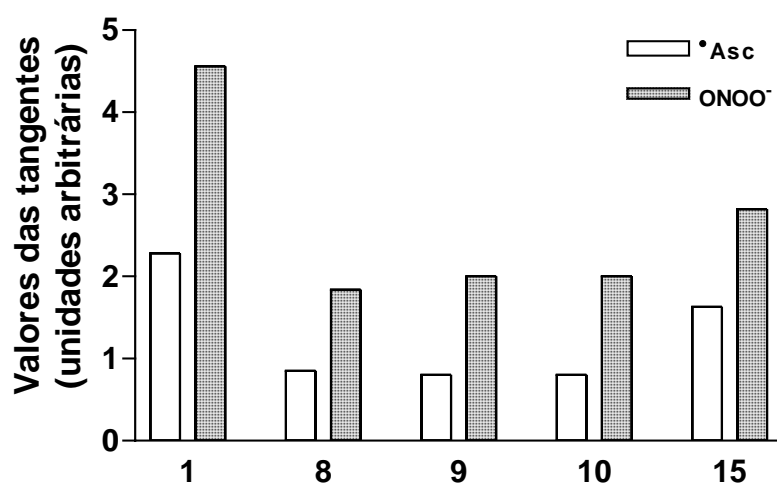


Figura 38: Valores das tangentes das curvas de proteção contra a lipoperoxidação induzida por \bullet Asc e por $ONOO^-$ em lipossomos de fosfatidilcolina dos compostos 1, 8, 9, 10 e 15.

Tabela 9: Valores das tangentes dos ângulos das curvas concentração-resposta da proteção da lipoperoxidação induzida por $^{\bullet}\text{Asc}$ e por ONOO^- em lipossomos de fosfatidilcolina pelo ácido gálico e galatos.

Composto	Tangente ($^{\bullet}\text{Asc}$)	Tangente (ONOO^-)	Log P
1- Ácido Gálico	2,28	4,56	0.89
2- Galato de metila	1,00	2,84	0.92
3- Galato de etila	1,80	3,24	1.27
4- Galato de propila	1,42	3,00	1.73
5- Galato de butila	1,60	3,00	2.13
6- Galato de pentila	1,28	2,50	2.53
7- Galato de hexila	0,92	2,50	2.92
8- Galato de heptila	0,85	1,84	3.32
9- Galato de octila	0,80	2,00	3.72
10- Galato de decila	0,80	2,00	4.51
11- Galato de undecila	0,90	2,34	4.90
12- Galato de dodecila	1,0	2,28	5.30
13- Galato de tetradecila	2,12	2,82	6.09
14- Galato de hexadecila	1,87	2,82	6.89
15- Galato de octadecila	1,63	2,82	7.68

Quanto menor a tangente da curva maior é a intensidade do efeito de proteção da lipoperoxidação. A partir destes resultados pode-se concluir que apesar dos compostos 8, 9 e 10 inibirem com maior intensidade a lipoperoxidação induzida por $^{\bullet}\text{Asc}$ e por ONOO^- , há uma maior dificuldade de proteção frente à lipoperoxidação pelo ONOO^- em comparação com a induzida pelo radical $^{\bullet}\text{Asc}$.

No modelo experimental utilizado não se pode afirmar a concentração efetiva de cada espécie reativa na indução da lipoperoxidação. Entretanto, as concentrações utilizadas são as que promovem um máximo de peroxidação

lipídica, haja vista que aumentando-se a concentração de cada espécie reativa não ocasiona um aumento na produção de TBARS. A Figura 39 demonstra a intensidade da lipoperoxidação induzida por $\bullet\text{Asc}$ e por ONOO^- nos protocolos experimentais padronizados no laboratório através da detecção de TBARS.

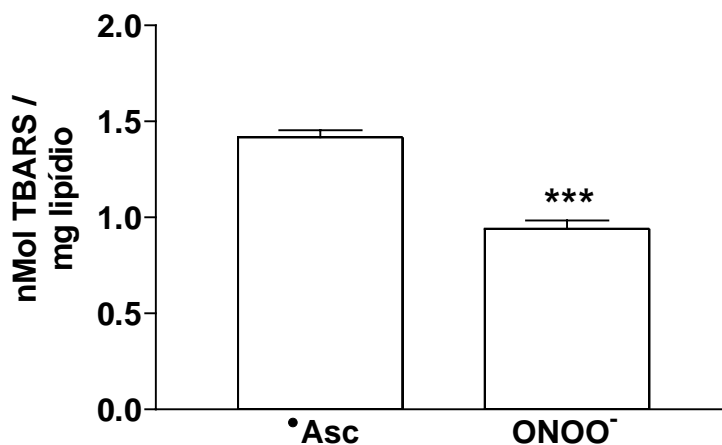


Figura 39: Gráfico da produção de nMol de TBARS por mg de lipídio em lipossomos de fosfatidilcolina pelas espécies reativas $\bullet\text{Asc}$ e ONOO^- . *** $p < 0,0001$.

A produção de TBARS é proporcional à extensão do dano oxidativo em lipídios. Desta forma, com base nos resultados apresentados na Figura 39, pode-se sugerir que, neste modelo experimental utilizado, o $\bullet\text{Asc}$ oxida mais intensamente os lipossomos de fosfatidilcolina do que o ONOO^- . Estes dados corroboram com os descritos por De Lima *et al.* (2004), que demonstraram que o radical $\bullet\text{Asc}$ promoveu uma maior produção de TBARS em diferentes modelos de membrana do que o ONOO^- . Entretanto, as IC_{50} s para a proteção da lipoperoxidação induzida pelo $\bullet\text{Asc}$ são menores do que as pelo ONOO^- . Isto pode ser explicado porque o ONOO^- possui uma química peculiar e a sua metabolização pode formar muitas outras espécies reativas que também provocam a lipoperoxidação (RADI *et al.*, 1991a.; RADI *et al.*, 1991b.; RADI *et al.*, 1994; RADI *et al.*, 2001; RADI *et al.*, 2002), além da difusibilidade do peroxinitrito

pelas membranas lipídicas que podem dificultar a ação dos antioxidantes (KHAIRUTDINOV *et al.*, 2000).

Já está bem caracterizada na literatura a atividade antioxidante de substâncias químicas polifenólicas, como os flavonóides, os tocoferóis, os carotenóides, entre outros. Tanto o ácido gálico quanto os seus derivados n-alquil-ésteres sintéticos possuem o anel polifenólico θ , m, ρ -trihidroxilado, que é um dos principais responsáveis pela atividade antioxidante destas moléculas. Contudo, observamos que as diferenças estruturais destes compostos, que conseqüentemente lhes proporciona diferentes propriedades físico-químicas, como a lipofilicidade, lhes confere diferentes intensidades de ação antioxidante. Deste modo, serão apresentadas a seguir as comparações entre a lipofilicidade do ácido gálico e dos seus derivados n-alquil-ésteres com os valores de suas IC₅₀s para todos os ensaios realizados neste trabalho, inclusive com os valores de EC₅₀s para a reatividade com DPPH e de IC₅₀s para proteção contra a lipoperoxidação induzida por \cdot Asc em microssomas de fígado de ratos descritos por Savi *et al.* (2005).

5.5. Estudo da influência da lipofilicidade relativa do ácido gálico e dos galatos na intensidade de ação antioxidante *in vitro*

Conforme citado anteriormente, a lipofilicidade relativa de uma determinada substância pode ser determinada através do cálculo do Log P, e que esta é afetada pelos diferentes substituintes da molécula. Assim, realizamos uma análise de correlação entre o Log P do ácido gálico e dos seus derivados n-alquil-ésteres sintéticos com as EC₅₀s de reatividade com o DPPH (Figura 40), e com as IC₅₀s de reatividade com HOCl (Figura 41), com as K_{0.5}s de inibição da atividade da mieloperoxidase (Figura 42), e com as IC₅₀s de proteção da lipoperoxidação em microssomas de fígado de ratos induzida pelo radical ascorbil (43), e da proteção contra a lipoperoxidação em lipossomos de fosfatidilcolina induzida por \cdot Asc (Figura 44) e por ONOO⁻ (Figura 45).

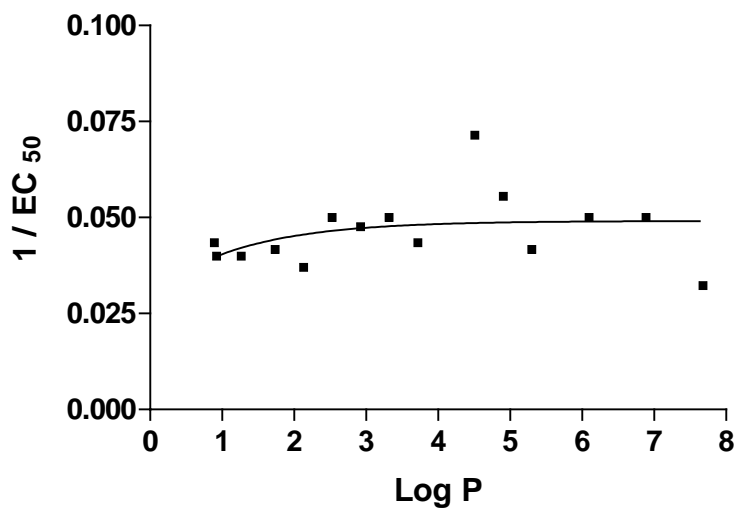


Figura 40: Relação $1/EC_{50}$ x Log P. Reatividade do ácido gálico e dos galatos com o DPPH. Os valores destas EC_{50} foram obtidos a partir do trabalho publicado por Savi *et al.* (2005).

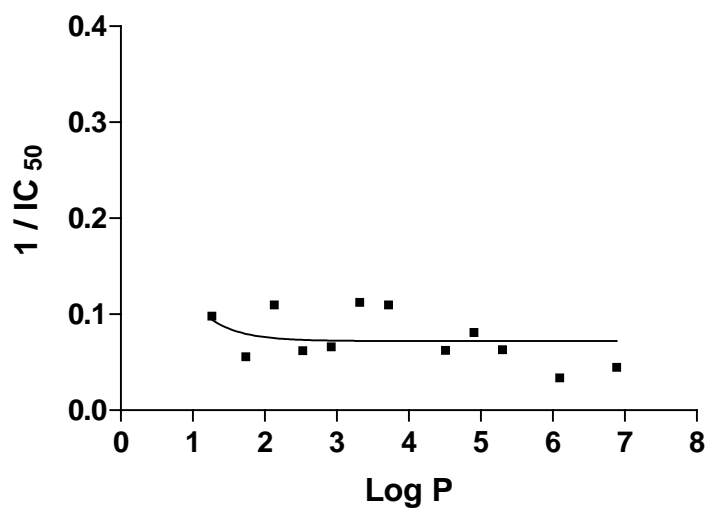


Figura 41: Relação $1/IC_{50}$ x Log P. Reatividade do ácido gálico e dos galatos com o HOCl.

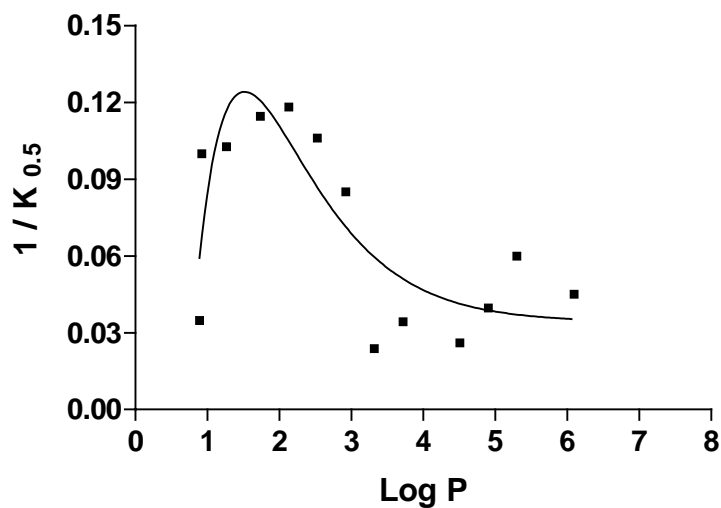


Figura 42: Relação $1/K_{0.5} \times \text{Log P}$. Efeito inibitório do ácido gálico e dos galatos sobre a atividade da mieloperoxidase.

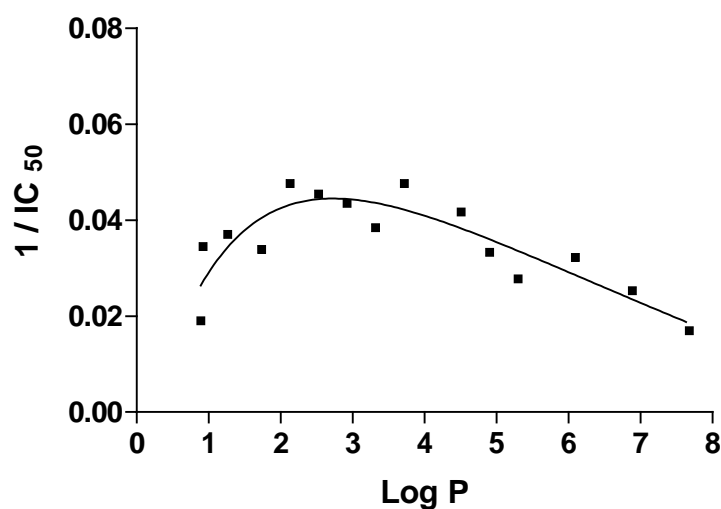


Figura 43: Relação $1/IC_{50} \times \text{Log P}$. Ação do ácido gálico e dos galatos contra a proteção da lipoperoxidação em microssomas de fígado de ratos induzida pelo radical ascorbil. Os valores destas IC_{50} foram obtidos a partir do trabalho publicado por Savi *et al.* (2005).

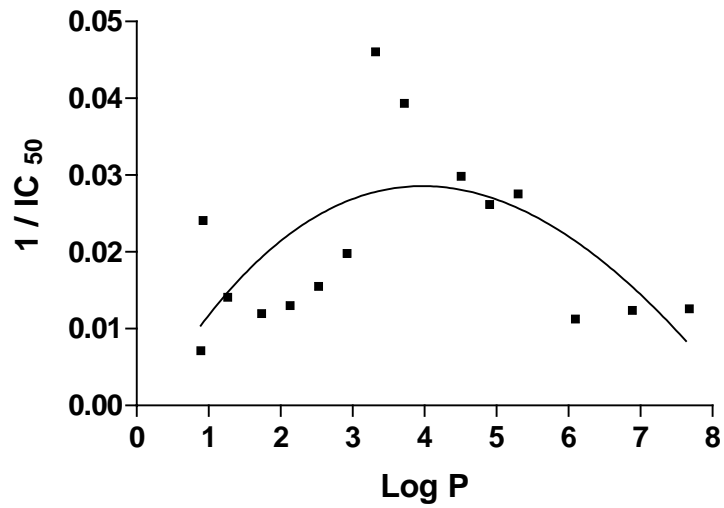


Figura 44: Relação $1/IC_{50}$ x Log P. Ação do ácido gálico e dos galatos contra a proteção da lipoperoxidação em lipossomos de fosfatidilcolina induzida por $\cdot\text{Asc}$.

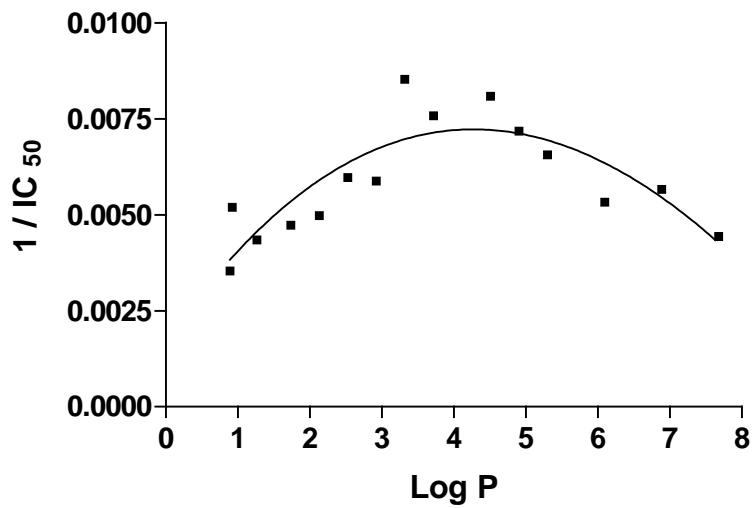


Figura 45: Relação $1/IC_{50}$ x Log P. Ação do ácido gálico e dos galatos contra a lipoperoxidação em lipossomos de fosfatidilcolina induzida pelo ONOO^- .

Estes gráficos demonstram a relação $1/EC_{50}$ e $1/IC_{50}$ versus Log P. Desta forma, quanto maior é esta relação maior é a intensidade do efeito antioxidante.

Nos ensaios de reatividade com DPPH e com HOCl, a lipofilicidade dos compostos não interferiu substancialmente no efeito antioxidante *in vitro*. Isto pode ser sugerido porque as curvas de correlação (Figura 40 e Figura 41) se comportam praticamente como uma reta. Outros estudos demonstraram que não há interferência entre lipofilicidade e reatividade com o DPPH (Ancerewiks *et al.*, 1998), e estudos similares de reatividade com o HOCl não foram encontrados na literatura até o momento.

Entretanto, quando há o envolvimento de materiais biológicos nas metodologias utilizadas, a lipofilicidade parece interferir na atividade. A avaliação de $1/K_{0.5} \times \text{Log P}$ apresentou uma parábola invertida evidenciando uma faixa de lipofilicidade ideal para a inibição desta enzima. Quanto à intensidade de inibição da mieloperoxidase, pode-se sugerir que, como o grupamento θ -dihidróxi parece ser o responsável por tal atividade (KROES *et al.* 1992) e está presente em todas as moléculas estudadas, o tamanho da cadeia alifática lateral pode estar atuando como um interferente espacial. Esta suposição é sustentada porque as IC_{50} de inibição foram menores para os compostos com até 6 carbonos na sua cadeia alifática lateral, e, além disso, os compostos 14 e 15, que são os que possuem mais carbonos na sua cadeia alifática lateral, não inibiram a enzima. Fica como dúvida, se isto é devido à uma interferência eletrônica, pois as interações hidrofóbicas são maiores conforme aumenta o tamanho da cadeia carbonílica, ou simplesmente à diferença estrutural destas moléculas, como uma interferência espacial no sítio ativo da enzima.

Já com relação aos estudos de lipoperoxidação, o Log P foi decisivo para a intensidade do efeito antioxidante do ácido gálico e de seus derivados n-alquil-ésteres sintéticos. De um modo geral, em lipossomos de fosfatidilcolina a intensidade do efeito protetor está maior nos compostos com Log P próximo a 4, permitindo sugerir que há uma maior interação entre estas moléculas e a membrana lipídica. Contudo, em microssomas de fígado de ratos, a intensidade do efeito protetor está maior nos compostos com Log P próximos a 2.5. Esta

diferença pode ser justificada devido a fatores, como composição lipídica, presença de proteínas, metais, antioxidantes intrínsecos, entre outros, presentes nos microsossomos (CASALINO *et al.*, 1996), que podem estar atuando como interferentes.

Marozienne *et al.* (2000) demonstraram a relação estrutura-atividade de alguns derivados do ácido gálico para a proteção da fotooxidação de eritrócitos, evidenciando que a intensidade de proteção foi na seguinte ordem: galato de octila > galato de butila > galato de etila > galato de metila > ácido gálico. Bennet *et al.* (2004) demonstraram que em derivados do α -tocoferol, uma maior intensidade da proteção da lipoperoxidação em microsossomos de fígado de ratos induzida por \bullet Asc é exercida pelas moléculas com Log P entre 5,5 e 6. Sergedienne *et al.* (1999) mostraram em seu trabalho que derivados do ácido gálico promoveram efeito citotóxico em células leucêmicas HL-60, e que a intensidade deste efeito foi similar ao descrito por Marozienne *et al.* (2000) (galato de octila > galato de butila > galato de etila > galato de metila > ácido gálico). Leal (2004), Rosso *et al.* (2004) e Rosso *et al.* (2005a), demonstraram que a lipofilicidade do ácido gálico e de seus n-alquil-ésteres sintéticos influencia na atividade antifúngica, antibacteriana e antileucêmica, respectivamente, e que, similarmente ao efeito antioxidante descrito neste trabalho, há uma maior intensidade nos compostos com Log P próximos a 4. Adicionalmente, Savi *et al.* (2005) demonstraram um comportamento similar para a atividade antiviral destas mesmas substâncias.

Além dos trabalhos mencionados, não foram encontrados outros relatos associando a hidrofobicidade de derivados do ácido gálico com a atividade biológica. Os resultados permitem sugerir que há uma maior interação dos compostos mais efetivos contra a lipoperoxidação com as membranas lipídicas. Deste modo, estão demonstrados a seguir os resultados dos ensaios de incorporação do ácido gálico e de alguns de seus derivados em lipossomos de fosfatidilcolina e a avaliação deste efeito na proteção contra a lipoperoxidação induzida por \bullet Asc e por ONOO $^-$.

5.6. Estudo da influência da incorporação do ácido gálico e de alguns derivados n-alkil-ésteres sintéticos em lipossomos de fosfatidilcolina

A interação de moléculas químicas com membranas biológicas pode alterar a conformação e o arranjo lipídico das membranas, bem como as suas propriedades. Dependendo da situação e objetivo, como é o caso do uso de quimioterápicos, esta interação é desejável. Adicionalmente, uma interação molecular entre o substrato oxidável e o antioxidante pode intensificar o efeito, como é o caso do α -tocoferol com as LDLs (LARANJINHA; CADENAS, 1999; HERRERA; BARBAS, 2001).

Primeiramente foram incorporados o ácido gálico (1), o galato de heptila (8), o galato de octila (9) e o galato de octadecila (15) em lipossomos de fosfatidilcolina pelo método de evaporação de filme lipídico. Foram escolhidos os compostos 8 e 9 para incorporação porque foram os mais efetivos contra a lipoperoxidação, e os compostos 1 e 15 porque possuem o menor e o maior valor de Log P respectivamente.

Antes da incorporação, foi necessária a determinação do coeficiente de extinção molar (ϵ) dos compostos. Conforme descrito na secção materiais e métodos, foram realizadas varreduras de absorbância UV-visível para a observação do comprimento de onda de máxima absorbância, que foi em 277 nm, e para a determinação do ϵ . Estas análises foram realizadas em triplicatas e os resultados estão demonstrados na Tabela 10. A quantidade incorporada de cada substância, bem como o rendimento de incorporação, estão demonstrados na Tabela 11.

Tabela 10: Valores dos coeficientes de extinção molar (ϵ) do ácido gálico, do galato de heptila, do galato de octila e do galato de octadecila.

	Valores dos ϵ_{277} ($M^{-1}cm^{-1}$)
1- Ácido gálico	13378
2- Galato de heptila	13025
3- Galato de octila	14903
4- Galato de octadecila	14879

Tabela 11: Concentração do ácido gálico (1), do galato de heptila (8), do galato de octila (9) e do galato de octadecila (15) incorporada nos lipossomos de fosfatidilcolina pelo método de extrusão e o rendimento.

Composto	Concentração incorporada (μM)	Rendimento (%)
1- Ácido gálico	31 ± 3	16
8- Galato de heptila	33 ± 1	16
9- Galato de octila	28 ± 1	14
15- Galato de octadecila	30 ± 2	15

*Nota: os resultados estão apresentados pela média \pm desvio padrão (n=3).

Neste ensaio foi possível observar que os compostos incorporam-se nos lipossomos com rendimento de aproximadamente 15%.

Após a incorporação dos compostos nos lipossomos, foi avaliada a proteção da lipoperoxidação induzida por $\cdot Asc$ e $ONOO^-$. Esta proteção foi comparada com a proteção proporcionada quando os galatos não estavam incorporados. Os resultados estão mostrados na Figura 46 onde pode-se observar que houve uma maior intensidade na proteção da lipoperoxidação pelos compostos 1 e 8 ($p < 0,05$) e 9 ($p < 0.001$) induzida por $\cdot Asc$. Já na proteção da

lipoperoxidação induzida por ONOO^- , não houve alterações significativas na intensidade da proteção.

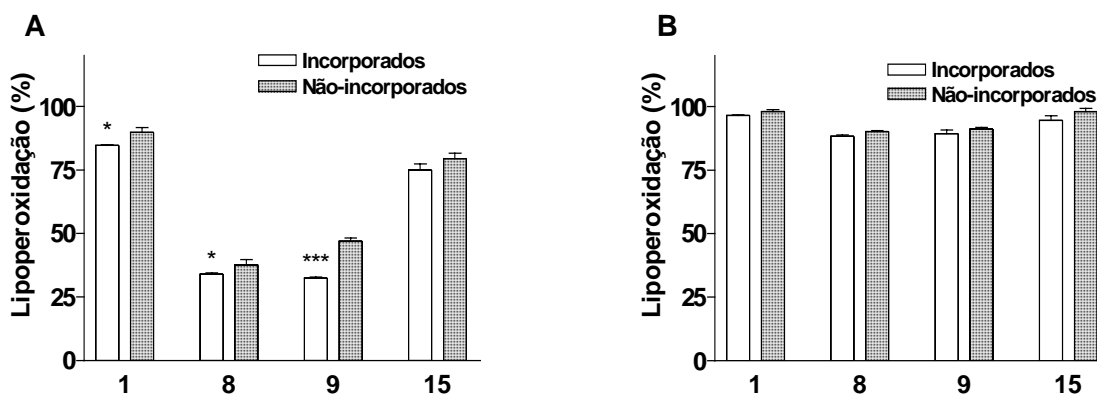


Figura 46: Comparação da proteção da lipoperoxidação induzida por Asc^\bullet (A) e por ONOO^- (B) em lipossomos de fosfatidilcolina entre os compostos 1- ácido gálico ($31,1 \mu\text{M}$), 8- galato de heptila ($32,9 \mu\text{M}$), 9- galato de octila ($28,3 \mu\text{M}$) e 15- galato de octadecila ($30,3 \mu\text{M}$) incorporados e não-incorporados. Para análise estatística foi utilizado o teste t de Student e foi considerado significativo um $p < 0.05$. Nota: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. Os resultados estão demonstrados pela média \pm desvio padrão ($n=3$).

Estes resultados não foram muito satisfatórios, deste modo, realizamos a incorporação do galato de heptila pelo método de diálise. A substância foi adicionada no momento em que a solução de fosfolipídios foi submetida à diálise, conforme descrito na secção materiais e métodos. Similarmente ao ensaio anterior, foi calculada a concentração de galato de heptila incorporada bem como o seu rendimento de incorporação (Tabela 12). Posteriormente, foi avaliada a proteção da lipoperoxidação nos lipossomos induzida por Asc^\bullet e ONOO^- e comparada com a proteção proporcionada quando o galato de heptila não estava incorporado (Figura 47).

Tabela 12: Concentrações incorporadas do galato de heptila em lipossomos de fosfatidilcolina pelo método de diálise.

	Concentração de partida (μM)	Concentração incorporada (μM)	Rendimento (%)
Ensaio 1	60	37 ± 3	60
Ensaio 2	60	40 ± 3	65
Ensaio 3	160	74 ± 2	46

*Nota: os resultados estão apresentados pela média \pm desvio padrão (n=3).

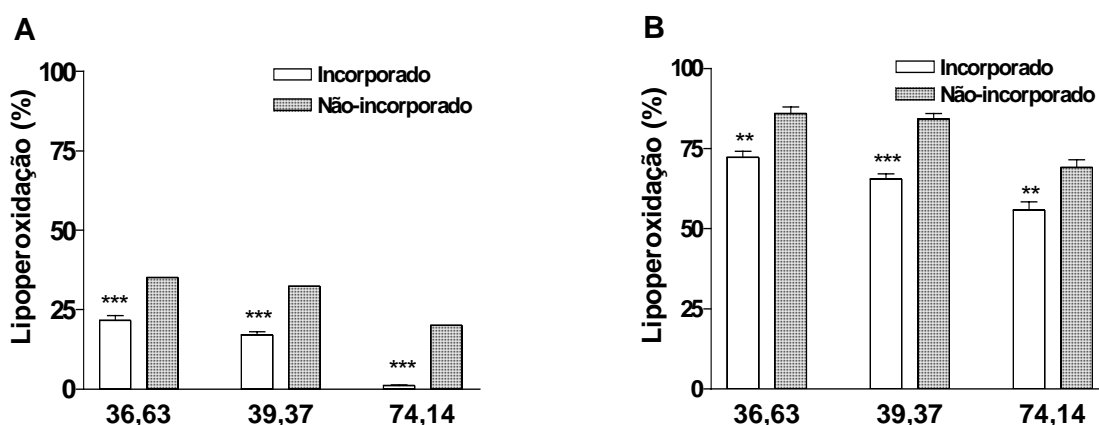


Figura 47: Comparação da proteção da lipoperoxidação induzida por $^*\text{Asc}$ (A) e por ONOO^- (B) em lipossomos de fosfatidilcolina entre o galato de heptila incorporado e não-incorporado. Para análise estatística foi utilizado o teste t de Student e foi considerado significativo um $p < 0,05$. Nota: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Os resultados estão demonstrados pela média \pm desvio padrão de cada triplicata.

A técnica de diálise foi mais eficaz para a incorporação do galato de heptila, pois aumentou o rendimento da incorporação (Tabela 12), ou seja, em torno de 60 % contra aproximadamente 15 % obtido pelo método de extrusão. Além disso, ocorreu um aumento mais significativo na proteção da lipoperoxidação (Figura 47) em comparação com o método de diálise (Figura 46). Estes resultados permitem sugerir que a interação destes compostos com membranas lipídicas é

um dos responsáveis pela proteção da lipoperoxidação destas moléculas. Esta interação com as membranas possivelmente pode ser a razão dos resultados obtidos na avaliação de outras atividades biológicas, como antiviral, antifúngica e antileucêmica já mencionadas, pois podem estar inibindo a propagação do processo de oxidação dos lipídios.

Este é um trabalho pioneiro com essa abordagem. Até o momento, não foram encontrados relatos na literatura sobre o estudo da influência da incorporação de ácido gálico ou de seus n-alquil-ésteres em lipossomos na atividade antioxidante. Deste modo, fica como perspectiva a incorporação dos demais derivados do ácido gálico em lipossomos de fosfatidilcolina através do método de diálise, bem como a utilização de lipossomos com diferentes constituições lipídicas.

5.7. Estudo da citotoxicidade do ácido gálico e dos seus n-alquil-ésteres sintéticos em tecido hepático de ratos

O ensaio de citotoxicidade em tecido hepático de ratos foi realizado com os compostos 1, 2, 8, 9 e 15. Estes compostos foram pré-selecionados de acordo com o seu Log P, de modo a abranger toda a faixa de lipofilicidade relativa (0,8918 – 7,6791) das moléculas em estudo. Os resultados deste ensaio estão demonstrados na Figura 48 e na Tabela 13.

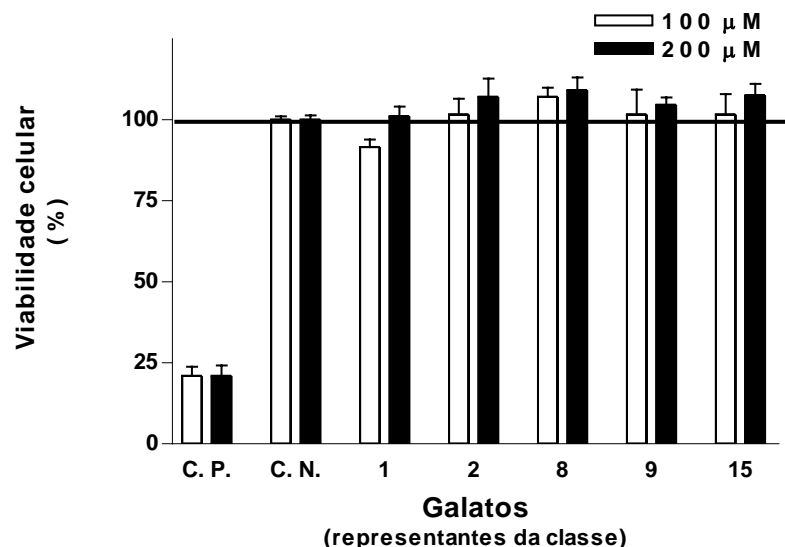


Figura 48: Resultado do ensaio de citotoxicidade dos galatos em tecido hepático de ratos. Este ensaio foi baseado na atividade redutora de enzimas mitocondriais que transformaram o MTT em um formazan púrpura insolúvel (capacidade de redução do MTT). Resultados apresentados em média \pm desvio padrão (n=3).

Tabela 13: Valores, em porcentagem, da viabilidade celular de tecido hepático de ratos após a adição de 100 e de 200 μ M do ácido gálico, do galato de etila, do galato de heptila, do galato de octila e do galato de octadecila.

	[100 μ M]	[200 μ M]	Log P
Ácido gálico (1)	92 \pm 1	101 \pm 3	0.89
Galato de metila (2)	101 \pm 5	107 \pm 6	0.92
Galato de heptila (8)	107 \pm 3	109 \pm 4	3.32
Galato de octila (9)	102 \pm 8	105 \pm 2	4.51
Galato de octadecila (15)	102 \pm 6	108 \pm 4	7.68

*Nota: os resultados estão apresentados em média \pm desvio padrão (n=3).

O ácido gálico e seus n-alquil-ésteres não apresentaram toxicidade em tecido hepático de ratos em até 200 μ M. O fígado é o principal órgão responsável pela metabolização e detoxificação de xenobióticos, e por isso está susceptível aos efeitos tóxicos dos mesmos. Deste modo, ficou demonstrado *in vitro* que o ácido gálico e os seus derivados n-alquil-ésteres sintéticos não apresentaram toxicidade em tecido hepático em concentrações muito superiores às das EC₅₀ para DPPH e IC₅₀ para proteção da lipoperoxidação induzida pelo radical ascorbil (SAVI *et al.*, 2005), e das IC₅₀ para os ensaios de reatividade com HOCl, de inibição da atividade da MPO, e de proteção da lipoperoxidação em lipossomos de fosfatidilcolina induzida por \cdot Asc e ONOO $^-$.

Estes resultados corroboram com o que foi descrito anteriormente por Savi *et al.* (2005), em que os mesmos compostos apresentaram CC₅₀ em células VERO (concentração dos compostos necessária para matar 50% das células) bastante superiores às concentrações antioxidantes *in vitro* (na ordem de milimolar). Em um outro trabalho, Yen *et al.* (2002), descreveram que o ácido gálico, a molécula química precursora dos demais compostos em estudo neste trabalho, não apresentou citotoxicidade em linfócitos humanos nas concentrações de até 4,17 mM.

Por outro lado, a atividade citotóxica do ácido gálico e de seus derivados, tem se mostrado promissora para o desenvolvimento de fármacos antitumorais. Inoue *et al.* (1994), relataram a atividade citotóxica do ácido gálico em células leucêmicas HL-60. Gomes *et al.* (2003) demonstraram a atividade antitumoral de derivados ésteres do ácido cafeico e do ácido gálico em células de adenocarcinoma. Fiuza *et al.* (2004), também demonstraram a atividade antitumoral de ésteres do ácido cafeico e do ácido gálico em células de adenocarcinoma.

Deste modo, conclui-se que o ácido gálico e os galatos não apresentaram toxicidade *in vitro* em concentrações superiores às efetivas para atividade antioxidante. Por estas razões o nosso grupo também está dedicando-se às pesquisas em relação à atividade antitumoral destes compostos que vêm mostrando resultados bastante promissores.

6. *Conclusões*

O ácido gálico é uma molécula química obtida geralmente de taninos hidrolizáveis de plantas. Muito se discute na literatura sobre atividades biológicas suas e de seus análogos. Entretanto, não há relatos na literatura, até o momento, sobre um estudo com tal abordagem e abrangência entre a estrutura química e a atividade biológica de derivados do ácido gálico. Os resultados obtidos neste trabalho permitem as seguintes conclusões com relação ao ácido gálico e seus n-alquil-ésteres sintéticos:

- Atuam como antioxidantes *in vitro*.
- Seqüestram HOCl.
- A reatividade dos compostos com o DPPH e com o HOCl não é influenciada pelo Log P dos compostos.
- Inibem a mieloperoxidase.
- Protegem a lipoperoxidação induzida por $^{\bullet}\text{Asc}$ e por ONOO^- .
- A lipofilicidade influencia na atividade antioxidante *in vitro*, principalmente nas atividades de inibição da MPO e de proteção da lipoperoxidação.
- A inibição da MPO é mais efetiva nos compostos com menos de 6 carbonos na cadeia alifática lateral. Pode-se sugerir que isto seja devido a alguma interação eletrônica ou a algum impedimento espacial no sítio ativo da enzima.
- A proteção da lipoperoxidação nos lipossomos é mais intensa nos compostos com Log P próximos a 4.
- Interação com membranas lipídicas, e este efeito está correlacionado com a proteção da lipoperoxidação.
- Os galatos podem ser incorporados nos lipossomas de fosfatidilcolina, comprovando que há uma interação entre estas moléculas e as membranas lipídicas.
- A método de diálise é mais eficaz para a incorporação dos compostos nos lipossomos.
- Os compostos não são tóxicos nas concentrações efetivas *in vitro*.

7. Perspectivas

Este trabalho proporcionou algumas conclusões pertinentes, e, ao mesmo tempo, as seguintes perspectivas promissoras de estudos relevantes:

- Como os compostos inibiram a MPO e seqüestraram HOCl, pode-se realizar estudos complementares com relação à atividade antiinflamatória destas moléculas.
- Pode-se realizar a incorporação dos demais galatos em lipossomos pelo método de diálise para estudar com maior clareza sobre a influência do Log P na interação com membranas.
- Realizar estes estudos de incorporação e de proteção da lipoperoxidação alterando a constituição lipídica dos lipossomos.
- Realizar ensaios complementares sobre a incorporação dos galatos nos lipossomos, como a ressonância magnética nuclear, para avaliar em que locais da membrana estes compostos estão interagindo com as membranas lipídicas.
- Avaliar a ação dos galatos incorporados ou não em diferentes sistemas lipídicos em outros modelos de atividade biológica.
- Realizar estudos complementares de toxicidade em modelos de animais.

8. Referências Bibliográficas

ACKER, S. A. B. E. V.; TROMP, M. N. J. L.; HAENEN, G. R. M. M.; VIJGH, W. J. F. V.; BAST, A. Flavonoids as scavengers of nitric oxide **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 214, p. 755-758, 1995.

AIKENS, J.; DIX, T. A. Perhydroxyl radical (HOO.) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 15091-15098, 1991.

AMSTAD, P. A.; KRUPITZA, G.; CERUTTI, P. A. Mechanism of c-fos induction by active oxygen. **Cancer Research**, v. 52, p. 3952-3960, 1992.

ANCEREWICZ, J.; MIGLIAVACCA, E.; CARRUPT, P. A.; TESTA, B.; BRÉE, F.; ZINI, R.; TILLEMENT, J. P.; LABIDALLE, S.; GUYOT, D.; CHAUVET-MONGES, A. M.; CREVAT, A.; RIDANTI, A. Structure–property relationships of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 25, p. 113–120, 1998.

ANDOH, T.; CHOCK, P. B.; CHIUEH, C. C. Preconditioning-mediated neuroprotection: role of nitric oxide, cGMP, and new protein expression. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 962, p. 1-7, 2002.

ARTEEL, G. E.; BRIVIBA, K.; SIES, H. Protection against peroxynitrite. **FEBS Letters**, v. 445, p. 226-230, 1999.

ARTEEL, G. E.; SIES, H. The biochemistry of selenium and the glutathione system. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 10, p. 153-158, 2001.

ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGERS, J. Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid. **Xenobiotica**, v. 22, p. 257-268, 1992.

ASCENZI, P.; BRUNORI, M. Myoglobin: a pseudo-enzymatic scavenger of nitric oxide. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 29, p. 183–185, 2001.

AZZI, A.; DAVIES, K. J. A.; KELLY, F. Free radical biology – terminology and critical thinking. **FEBS Letters**, v. 558, p. 3-6, 2004.

BENNETT, C. J.; CALDWELL, S. T.; MCPHAIL, D. B.; MORRICE, P. C.; DUTHIE, G. G.; HARTLEY, R. C. Potential therapeutic antioxidants that combine the radical scavenging ability of myricetin and the lipophilic chain of vitamin E to effectively inhibit microsomal lipid peroxidation. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 2079–2098, 2004.

BERLETT, B. S.; STADTMAN, E. R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 20313-20316, 1997.

BIRD, R.P.; DRAPER, A.H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 295-305, 1984.

BOTTI, H.; BATHYÁNY, C.; TROSTCHANSKY, A.; RADI, R.; FREEMAN, B. A.; RUBBO, H. Peroxynitrite-mediated α -tocopherol oxidation in Low-density lipoprotein: a mechanistic approach. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, p. 152-162, 2004.

BUCHER, D. L. Antioxidants for fish oils. **Fishery Market News**, v. 7, p. 17-19, 1945.

BURMESTER, T.; WEICH, B.; REINHARDT, S.; HANKELN, T. A vertebrate globin expressed in the brain. **Nature**, v. 507, p. 520-523, 2000.

CASALINO, E.; SBLANO, C.; LANDRISCINA, C. A possible mechanism for initiation of lipid peroxidation by ascorbate in rat liver microsomes. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 28, p. 137-149, 1996.

CASTELI, F.; TROMBETA, D.; TOMAIANO, A.; BONINA, F.; ROMEO, G.; UCCELLA, N.; SAIJA, A. Dipamitoylphosphatidylcholine/linoleic acid mixed unilamellar vesicles as model membranes for studies on novel free-radical scavengers. **Journal of Pharmacological Toxicological Methods**, v. 37, p. 135-141, 1997.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. *In*: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó:Editora Universitária ARGOS, 2001. Parte I, Cap. 1, 47-75.

CHEN, S.; SCHOPFER, P. Hydroxyl-radical production in physiological reactions. **European Journal of Biochemistry**, v. 260, p. 726-735, 1999.

CHENG, H.; LIN, C.; LIN, T. Antiherpes simplex virus type 2 activity of casuarinin from the bark of *Terminalia arjuna* Linn. **Antiviral Research**, v. 55, p. 447-455, 2002.

CHING, T. L.; JONG, J. de; BAST, A. A Method for screening Hypochlorous Acid Scavengers by Inhibition of the Oxidation of 5'thio-2-nitro-benzoic Acid: Application to Anti-asthmatic Drugs. **Analytical Biochemistry**, v. 218, p. 377-381, 1994.

COURDEROT-MASUYER, C.; LAHET, J. J.; VERGES, B.; BRUN, J. M.; ROCHETTE, L. Ascorbyl free radical release in diabetic patients. **Cell and Molecular Biology**, v. 46, p.1397-1401, 2000.

CORDOVA, C. A. S. de ; SIQUEIRA, I. R. ; NETTO, C. A.; YUNES, R. A.; VOLPATO, A. M.; FILHO, V. C.; CURI-PEDROZA, R.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Protective Properties of Butanolic Extract of the *Calendula Officinalis* (marigold) Against Lipid Peroxidation of Rat Liver Microsomes and Action as Free Radical Scavenger. **Redox Report**, v. 7, p. 95-102, 2002.

COSTA, M. T.; FABEN, R. C.; APTEKMANN, K. P.; MACHADO, R. R. Diferentes papéis do óxido nítrico com ênfase nas neoplasias. **Ciência Rural**, v. 33, p. 967-974, 2003.

CRECZYNSKI-PASA, T.B.; GRÄBER, P. ADP binding and ATP synthesis by reconstituted H⁺-ATPase from chloroplasts. **FEBS Letters**, v. 350, p. 195-198, 1994.

CRECZYNSKI-PASA, T. B.; BONETTI, V. R.; BEIRITH, A.; CKLESS, K.; KONZEN, M.; SEIFRIZ, I.; PAULA, M. S.; FRANCO, C. V.; WILHELM-FILHO, D.; CALIXTO, J. B. Complexes trans-[RuCl₂(nic)₄] as a free radical scavengers. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 86, p. 587-594, 2001.

DA SILVA, J. B. Gallic acid, pyrogallol and pyrocatechol in the roots of *Byrsonima intermedia* Ad. Jussieu, form *Latifolia* grisebach. **Revista de farmácia e bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 8, p. 187-192, 1970.

DAENEN, S.; VAN DER HOLT, B.; VERHOEF, G. E.; LOWENHEBERG, B.; WIJERMANS, P. W.; HUGJENS, P. C.; KOOY, R. V. M.; SCHOUTEN, H. C.; KRAMER, M. W.; FERRANT, A.; VAN DEN BERG, E.; STEIJAERT, M. M.; VERDONCK, L. F.; SONNEVELD, P. Addition of cyclosporin A to the combination of mitoxantrone and etoposide to overcome resistance to chemotherapy in refractory or relapsing acute myeloid leukaemia: A randomised phase II trial from HOVON, the Dutch–Belgian Haemato-Oncology Working Group for adults. **Leukemia Research**, v. 28, p. 1057-1067, 2004.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A.; COLOMBO, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, p. 23-28, 2003.

DANSON, R. M. C.; ELLIOT, D. L.; ELLIOT, W. H.; JONES, K. M. **Data for Biochemical Research**. 3. ed. Oxford: Oxford University, 1986, 580 p.

DATTA, R.; HALLAHAN, D. E.; KHARBANDA, S. M.; TUBIN, E.; SHERMAN, M. L.; HUBERMAN, E.; WEICHSELBAUM, R. R.; KUFE, D. W. Involvement of reactive oxygen intermediates in the induction of c-jun gene transcription by ionizing radiation. **Biochemistry**, v. 31, p. 8300 – 8306, 1992.

DAVIES, J. M.; HORWITZ, D.A.; DAVIES, K. J. Potential roles of hypochlorous acid and N-chloroamines in collagen breakdown by phagocytic cells in synovitis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 15, p. 637-643, 1993.

DE LIMA, V. R.; MORFIM, M. P.; TEIXEIRA, A.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Relationship between the action of reactive oxygen and nitrogen species on bilayer membrane and antioxidants. **Chemistry and Physics of lipids**, v. 132, p. 197–208, 2004.

DIXON, R. A. Natural products and disease resistance. **Nature**, v. 411, p. 843-847, 2001.

ESPEY, M. G.; MIRANDA, K. M.; THOMAS, D. D.; XAVIER, S.; CITRIN, D.; VITEK, M. P.; WINK, D. A. A chemical perspective on the interplay between NO, reactive oxygen species, and reactive nitrogen oxide species. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 962, p. 195-206, 2002.

ESTÉVEZ, A. G.; JORDÁN, J. Nitric oxide and superoxide, a deadly cocktail. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 962, p. 207-211, 2002.

FERDINAND, S.; SOLA, C.; VERDOL, B.; LEGRAND, E.; GOH, K. S.; BERCHEL, M.; AUBÉRY, A.; TIMOTHÉE, M.; JOSEPH, P.; PAPE, J. W.; RASTOGI, N. Molecular Characterization and Drug Resistance Patterns of Strains of *Mycobacterium tuberculosis* Isolated from Patients in an AIDS Counseling Center in Port-au-Prince, Haiti: a 1-Year Study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 694-702, 2003.

FIUZA, S. M.; GOMES, C.; TEIXEIRA, L. J.; GIRAO, C. M. T.; CORDEIRO, M. N.; MILHAZES, N.; BORGES, F.; MARQUES, M. P. Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties--a structure-activity relationship study. Part 1: methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 3581-3589, 2004.

FIRUZI O, MLADENKA P, PETRUCCI R, MARROSU G, SASO L. Hypochlorite scavenging activity of flavonoids. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, p. 801-807, 2004.

FLESchIN, S.; FLESchIN, M.; NITA, S.; PAVEL, E.; MAGEARU, V. Free radicals mediated protein oxidation in biochemistry. **Roumanian Biotechnological Letters**, v. 5, p. 479-495, 2000.

FORGO I; BUCHI J. Synthesis, physical-chemical properties and antioxidative effect of some gallic acid esters. 1. Nature, mechanism of action and properties of antioxidants. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 45, p. 207-226, 1970.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, p. 97-112, 1995.

FROLOV, A. F.; MISHENKOVA, E. L. Inhibitory effect of some preparations from higher plants on reproduction of influenza virus in vitro and in vivo. **Mikrobiologichnii Zhurnal**, v. 32, p. 628-633, 1970.

GIASSON, B. I.; ISCHIROPOULOS, H.; LEE, V. M.; TROJANOWSKI, J. Q. The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 32, p. 1264-1275, 2002.

GOMES, C. A.; CRUZ, T. G.; ANDRADE, J. L.; MILHAZES, N.; BORGES, F.; MARQUES, M. P. M. Anticancer Activity of Phenolic Acids of Natural or Synthetic Origin: A Structure-Activity Study. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 5395-5401, 2003.

GREEN, L. C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131-138, 1982.

GRUNDHOFER, P.; NIEMETZ, R.; SCHILLING, G.; GROSS, G. G. Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolyzable tannins. **Phytochemistry**, v. 57; p. 915-927, 2001.

GUTTERIDGE, J. M. C. Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. **FEBS Letters**, v. 201, p. 291-295, 1986.

GUVEN K. C.; KOYUNCUOGLU H.; ULUBELEN A.; GUVEN, N. Studies on gallic acid esters formed by the extraction of Paeonia peregrina Mill. **Die Pharmazie**, v. 29, p.350, 1974.

HALLIWELL, B.; WASIL, M.; GROOTVELD, M. Biologically significant scavenging of the mieloperoxidase-derived oxidant hypochlorous acid by ascorbic acid. **FEBS Letters**, v. 213, p. 15-18, 1987.

HALLIWELL, B. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. **Mutation Research**, v. 443, p. 37–52, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, M.C. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Oxford University Press, 2000.

HERRERA, E.; BARBAS, C. Vitamin E: action, metabolism and perspectives. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 57, p. 43-56, 2001.

HERTOG, M. G.; FESKENS, E. J.; HOLLMAN, P. C.; KATAN, M. B.; KROMHOUT, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. **The Lancet**, v. 342, p.1007– 1011, 1993.

HILT, W.; WOLF, D. H. Proteasomes: destruction as a programmed. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 21, p. 96-102, 1996.

HOPE, M. J.; BALLY, M. B.; MAYER, L. D.; JANOFF, A. S.; CULLIS, P. R. Generation of multilamellar and unilamellar phospholipids vesicles. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 40, p. 89-107, 1986.

ISOYAMA, N.; OKAZOE, K.; ICHIMURA, N.; SUGIHARA, Y.; KONO, T. Synthesis of antitrichophytal drugs derived from gallic acid. **Nichidai Igaku Zasshi**, v. 27, p. 270-272, 1968.

INOUE, M.; SUZUKI, R.; KOIDE, T.; SAKAGUCHI, N.; OGIHARA, Y.; YABU, Y. Antioxidant, Gallic Acid, Induces Apoptosis in HL-60RG Cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 204, p. 898-904, 1994.

JENNEY, J. R.; FRANCIS, E.; VERHAGEN, M. F. J. M. Anaerobic microbes: oxygen detoxification without superoxide dismutase. **Science**, v. 286, p. 306-309, 1999.

KATO, Y.; NAGAO, A.; TERAOKA, J.; OSAWA, T. Inhibition of myeloperoxidase-catalyzed tyrosylation by phenolic antioxidants *in vitro*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 67, p. 1136-1139, 2003.

KEHRER, J. P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 1, p. 21-48, 1993.

KEHRER, J. P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology**, v. 149, p. 43-50, 2000.

KIM, Y. K.; GUO, Q.; PACKER, L. Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts. **Toxicology**, v. 172, p. 149-156, 2002.

KISS, J. P. Role of nitric oxide in the regulation of monoaminergic neurotransmission. **Brain Research Bulletin**, v. 52, p. 459-466, 2000.

KLAUNIG, J.E.; KAMENDULIS, L.M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 44, p. 239-267, 2004.

KLEINVELD, H. A.; SWAAKA, J. G.; HACK, C. E. Interaction between oxygen free radicals and proteins. Implications for rheumatoid arthritis. An overview. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 18, p. 341-52, 1989.

KLOTZ, L. O.; SIES, H. Defensas against peroxynitrite: selenocompounds and flavonoids. **Toxicology Letters**, v. 143, p. 125-132, 2003.

KNOTT, H. M.; BAOUTINA, A.; DAVIES, M. J.; DEAN, R. T. Comparative time-courses of copper-ion-mediated protein and lipid oxidation in low-density lipoprotein. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 400, p. 223-232, 2002.

KONG, S. K.; CHOI, Y. M.; LEE, C. Y. The nitric oxide donor, sodium nitroprusside, increased intranuclear and cytosolic free calcium concentration in single PU5-1.8 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 199, p. 234 - 240, 1994.

KOPPENOL, W. H. Oxyradical reactions: from bond-dissociation energies to reduction potentials. **FEBS Letters**, v. 264, p. 165-167, 1990.

KOPPENOL, W.H.; KISSNER, R.; BECKMAN, J.S. Synthesis of peroxynitrite: To go with flow or on solid grounds? **Methods in Enzymology**, v. 269, p. 296-302, 1996.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química Farmacêutica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara dois S. A., 1982.

KORTH, H. Formation of gallic acid from quinic acid by *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas fluorescens*. **Archiv für Mikrobiologie**, v. 89, p. 67-72. 1973.

KRING, P.; FERROSAN, L.; MALMO, S. Investigations of the ability of some esters of gallic acid and of a few other substances to prevent rancidification of different fats. **Dansk Tidsskrift for Farmaci**, v. 24, p. 211-227, 1950.

LARANJINHA, J.; CADENAS, E. Redox cycles of caffeic acid, alpha-tocopherol, and ascorbate: implications for protection of low-density lipoproteins against oxidation. **IUBMB Life - A Journal of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 48, p.57-65, 1999.

LEAL, P. C. **Síntese e avaliação da atividade antifúngica de compostos derivados do ácido gálico**. 2004. 83 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 2004.

LEONG, S. K.; RUAN, R.S.; ZHANG, Z. A critical assessment of the neurodestructive and neuroprotective effects of nitric oxide. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 962, p. 161-181, 2002.

LEPOIVRE, M., FLAMAN, J., BOBE, P., LEMAIRE, G., AND HENRY, Y. Quenching of the tyrosyl free radical of ribonucleotide reductase by nitric oxide. Relationship to cytostasis induced in tumor cells by cytotoxic macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 21891–21897, 1994.

LEVINE, R. L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 32, p. 790-796, 2002.

LIPTON, S. A. Neuronal protection and destruction by NO. **Cell Death & Differentiation**, v. 6, p. 943-51, 1999.

LIU, Y.; PETERSON, D. A.; KIMURA, H.; SCHUBERT, D. Mechanism of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **Journal of Neurochemistry**, v. 69, p. 581-593, 1997.

LOMBARDI, G.; LUZZARO, F.; DOCQUIER, J.; RICCIO, M. L.; PERILLI, M.; COLÌ, AMICOSANTE, G.; ROSSOLINI, G. M.; TONIOLO, A. Nosocomial Infections Caused by Multidrug-Resistant Isolates of *Pseudomonas putida* Producing VIM-1 Metallo- β -Lactamase. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 4051-4055, 2002.

LONG, H.; EVANS, P. J.; HALLIWEL, B. Hydrogen Peroxide in Human Urine: Implications for Antioxidant Defense and Redox Regulation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 262, p. 605–609, 1999.

LOTITO, S. B.; FREI, B. Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma: contrasting *in vitro* and *in vivo* effects. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, p. 201-211, 2004.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LYELL, J. On the use of gallic acid in the treatment of albuminuria. **The Lancet**, v. 54, p. 608 – 609, 1849.

MAHADEVAN, A.; REDDY, M. K. Effect of phenolic compounds on growth, polygalacturonase production, and activity of *Fusarium oxysporum*. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v. 74, p. 87-90, 1968.

MAIORINO, M.; AUMANN, K. D.; BRIGELIUS-FLOHE, R.; DORIA, D.; VAN DEN HEUVEL, J.; MCCARTHY, J.; ROVERI, A.; URSINI, F.; FLOHE, L. Probing the presumed catalytic triad of selenium-containing peroxidases by mutational analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, v. 376, p. 651-660, 1995.

MANACH, C.; TEXIER, O.; MORAND, C.; CRESPIY, V.; REGERAT, F.; DEMIGNE, C.; REMESY, C. Comparison of the bioavailability of quercetin and catechin in rats. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, p. 1259-1266, 1999.

MANEVICH, Y.; FISHER, A. B. Peroxiredoxin 6, a 1-Cys peroxiredoxin, functions in antioxidant defense and lung phospholipids metabolism. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 38, p. 1422 – 1453, 2005.

MAROZIENE, A.; KLIUKIENE, R.; SARLAUSKAS, J.; CÉNAS, N. Inhibition of phthalocyanine-sensitized photohemolysis of human erythrocytes by polyphenolic antioxidants: description of quantitative structure-activity relationships. **Cancer Letters**, v. 157, p. 39-44, 2000.

MATES, J. M.; PEREZ-GOMEZ, C.; NUNEZ DE CASTRO, I. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical Biochemistry**, v. 32, p. 595–603; 1999.

McCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, p. 6049-6055, 1969.

MÉNARD, H. A., EL-AMINE, M. The calpain-calpastatin system in rheumatoid arthritis. **Immunology Today**, v. 17, p. 545-547, 1996.

MGEBRISHVILI, M. A. Extraction isolation of gallic acid in the "liquid-liquid" system. **Soobshcheniya Akademii Nauk Gruzinskoi SSR**, v. 86, p. 625-628, 1977.

MOLL, M.; FLAYEUX, R.; BAZARD, D.; MOUET, A. Separation of phenolic acids by HPLC. Applications to beer. **Bulletin de Liaison - Groupe Polyphenols**. v. 8, p.364-368, 1978.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Review**, v. 43, p. 109-142, 1991.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A.; FURCHGOTT, R. XIV International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. **Pharmacological Review**, v. 49, p. 137-142, 1997.

MOSKOVITZ, J.; RAHMAN, M. A.; STRASSMAN, J.; YANCEY, S. O.; KUSHNER, S. R.; BROT, N.; WEISSBACH, H. Escherichia coli peptide methionine sulfoxide reductase gene: regulation of expression and role in protecting against oxidative damage. **Journal of Bacteriology**, v. 177, p. 502-507, 1995.

MUKHERJEE, J. S.; RICH, M. L.; SOCCI, A. R. *et al.* Programmes and principles in treatment of multidrug-resistant tuberculosis. **The Lancet**, v. 36, p. 474-481, 2004.

NAKAGAWA, T.; YOKOZAWA, T. Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p.1745–1750, 2002.

NIEMETZ, R.; GROSS, G. G. Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis. **Phytochemistry**, In Press, 2005.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian Thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, p. 1287–1312, 2001.

OHKAWA, H.; OSHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal-tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.

PAGANI, P.; MANTENGOLI, E.; MIGLIAVACCA, R.; NUCLEO, E.; POLLINI, S.; SPALLA, M.; DATURI, R.; ROMERO, E.; ROSSOLINI, G. M. Multifocal Detection of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Producing the PER-1 Extended-Spectrum β -Lactamase in Northern Italy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 2523-2529, 2004.

PANASENKO, O. M.; PANASENKO, O. O.; BRIVIBA, K.; SIES, H. Hypochlorite destroys carotenoids in low density lipoproteins thus decreasing their resistance to peroxidative modification. **Biochemistry**, v. 62, p. 1140-1145, 1997.

PATEL, R. P.; McANDREW, J.; SELLAK, H.; WHITE, R. C.; JO, H.; FREEMAN, B. A.; DARLEY-USMAR, V. M. Biological aspects of reactive nitrogen species. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1411, p. 385-400, 1999.

PELLER, M. S.; JACOB, H. S. Cytochrome P-450 mediates tissue-damaging $\cdot\text{OH}$ formation during reoxygenation of the kidney. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, p. 7002-7006, 1994.

PELLEGRINO, F. L. P. C.; TEIXEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. S.; NOUÉR, S. A.; OLIVEIRA, M. P.; SAMPAIO, J. L. M.; FREITAS, A. D.; FERREIRA, A. L. P.; AMORIM, E. L. T.; RILEY, L. W.; MOREIRA, B. M. Occurrence of a Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clone in Different Hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 2420-2424, 2002.

PIETRI, S.; SÉGUIN, J. R.; D'ARBIGNY, P.; CULCASI, M. Ascorbyl free radical: a noninvasive marker of oxidative stress in human open-heart surgery. **Free Radical Biology & Medicine**. V. 16, p. 523-528, 1994

RADI, R.; BECKMAN, J.S.; BUSH, K.M.; FREEMAN, B.A. Peroxynitrite oxidation of sulphhydryls -the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 4244-4250, 1991a.

RADI, R.; BECKMAN, J.S.; BUSH, K.M.; FREEMAN, B.A. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 288, p. 481–487, 1991b.

RADI, R.; RODRIGUEZ, M.; CASTRO, L.; TELLERI, R. Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. V. 308, p. 89-95, 1994.

RADI, R.; PELUFFO, G.; ALVAREZ, M. N.; NAVILIAT, M.; CAYOTA, A. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 30, p. 463-488, 2001.

RADI, R.; CASSINA, A.; HODARA, R.; QUIJANO, C.; CASTRO, L. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, p. 1451-1464, 2002.

RANG, H. P.; RITTER, J. M.; DALE, M. M. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Hoogan S. A., 1997.

RAO, T. S.; YU, S. S.; DJURIC, S. W.; ISAKSON, P. C. Phorbol ester-induced dermal inflammation in mice: evaluation of inhibitors of 5-lipoxygenase and antagonists of leukotriene B₄ receptor. **Journal of Lipid Mediators and Cell Signaling**, v. 10, p. 213-228, 1994.

REFSGAARD, H. H. F.; TSAI, L.; STADTMAN, E. R. Modifications of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products. **Biochemistry**, v. 7, p. 611-616, 1999.

REIF, D. W.; SIMMONS, R. D. Nitric oxide mediates iron release from ferritin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 283, p. 537-541, 1990.

REITER, R. J. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. **Progress in Neurobiology**, v. 56, p. 359-384, 1998.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.

ROSSO, R.; REGINATTO, F. H.; BARELLI, C.; LÜCKEMEYER, D. D.; KAPPEL, V.; LEAL, P. C.; YUNES, R. A.; NUNES, R. J.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana de compostos fenólicos sintéticos. In: **XXXVIII Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica**. Divulgação digital, Florianópolis, Brasil, 2004.

ROSSO, R.; LICINIO, M. A.; SOUZA, C. A. DE; SOUZA, N. A. DE; BAZZO, M. L.; SANTOS-SILVA, M. C.; LEAL, P. C., YUNES, R. A., NUNES, R., CRECZYNSKI-PASA, T. B. Relationship between lipophilicity and cytotoxic effect of gallic acid n-alkyl-esters on leukemic lymphoblastic cells I-1210. In: **XXXIV Reunião anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**. Divulgação digital, Águas de Lindóia, Brasil, 2005.

ROSSO, R.; LOCATELLI, C.; LICÍNIO, L.; SOUZA, C. A. DE; SANTOS-SILVA, M. C.; LEAL, P. C.; YUNES, R. A.; NUNES, R.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Influence of glutathione depletion and nf-kb inhibition on the cytotoxic effect of n-alkyl-ester of gallic acid in I-1210 leukemic cells. In: **IV Meeting of the South American Group of the Society for Free Radical Biology and Medicine**. Divulgação digital, Águas de Lindóia, Brasil, 2005.

SAMPSOM, G. On the use of gallic acid in cases of albuminous urine. **The Lancet**, v. 54, p. 577 – 578, 1849.

SANCHEZ, J. J.; ABREU, P.; GONZALEZ, M. C. Sodium nitroprusside stimulates I-DOPA release from striatal tissue through nitric oxide and cGMP. **European Journal of Pharmacology**, v. 438, p. 79– 83, 2002.

SAKAGAMI, H.; SAKAGAMI, T.; YOSHIDA, H.; OMATA, T.; SHIOTA, F.; TAKAHASHI, H.; KAWAZOE, Y.; TAKEDA, M. Hypochlorite scavenging activity of polyphenols. **Anticancer Research**, v. 15, p. 917-921, 1993.

SAVI, L. A.; LEAL, P. C.; VIEIRA, T. O.; ROSSO, R.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; BARARDI, C. R. M.; SIMOES, C. M. O. Evaluation of anti-herpetic and antioxidant activities, and cytotoxic and genotoxic effects of synthetic alkyl-esters of gallic acid. **Arzneimittel Forschung Drug Research**, v. 55, p. 66-75, 2005.

SCHENKMAN, J.B.; CINTI, D.L. Preparation of microsomes with calcium. **Methods Enzymology**, v. 52, p. 83-89, 1978.

SELLOUM, L.; DJELILI, H.; SEBIHI, L.; ARNHOLD, J. Scavenger effect of flavonols on HOCl-induced luminol chemiluminescence. **Luminescence**, v. 19, p. 199-204, 2004.

SERGEDIENE, E.; JONSSON, K.; SZYMUSIAK, H.; TYRAKOWSKA, B.; RIETJENS, I. M. C. M.; CÉNAS, N. C. Prooxidant toxicity of polyphenolic antioxidants to HL-60 cells: description of quantitative structure-activity relationships. **FEBS Letters**, v. 462, p. 392-396, 1999.

SEVANIAN, A.; NORDENBRAND, K.; KIM, E.; ERNSTER, L.; HOCHSTEIN, P. Microsomal lipid peroxidation: the role of NADPH--cytochrome P450 reductase and cytochrome P450. **Free radical biology and medicine**, v. 8, p. 145-152, 1990.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, p. 291-295, 1997.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, p. 916-921, 1999.

SIES, H.; STAHL, W. Carotenoids and UV protection. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 3, p. 749-752, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade/UFRGS/Editora da UFSC, 2003.

SONE, N.; YOSHIDA, M.; HIRATA, H.; KAGAWA, Y. Reconstitution of vesicles capable of energy transformation from phospholipids and adenosine triphosphatase of thermophilic bacterium. **Journal of Biochemistry**, v. 81, p. 519-528, 1977.

STAHL, W.; SIES, H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 30, p. 101-107, 2005.

STAMBRO, W. D. A kinetic model of the myeloperoxidase-hydrogen peroxide - chloride ion system in phagolysosomes. **Journal of Theoretical Biology**, v. 193, p. 59-68, 1998.

STAMBRO, W. D. Modeling the interaction of peroxynitrite with low-density lipoproteins I: plasma levels of peroxynitrite. **Journal of Theoretical Biology**, v. 205, p. 457-464, 2000.

SZABÓ, C.; SOUTHAN, G. J.; THIEMERMANN, C.; VANE, J. R. The mechanism of the inhibitory effect of polyamines on the induction of nitric oxide synthase. **British Journal of Pharmacology**, v. 11, p. 757-766, 1994.

TEMALET, C.; YAHY, N.; TOURRÈS, C.; COLSON, P.; QUINSON, A.; POIZOT-MARTIN, I.; DHIVER, C.; FANTINI, J. Multidrug Resistance Genotypes (Insertions in the $\beta 3-\beta 4$ Finger Subdomain and MDR Mutations) of HIV-1 Reverse Transcriptase from Extensively Treated Patients: Incidence and Association with Other Resistance Mutations. **Virology**, v. 270, p. 310-316, 2000.

TAMEZ, P. A.; LANTVIT, D.; LIM, E.; PEZZUTO, J. M. Chemosensitizing action of cepharanthine against drug-resistant human malaria, *Plasmodium falciparum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 137-142, 2005.

TANIMURA, S.; KADOMOTO, R.; TANAKA, T.; ZHANG, Y.; KOUNO, I.; KOHNO, M. Suppression of tumor cell invasiveness by hydrolyzable tannins (plant polyphenols) via the inhibition of matrix metalloproteinase-2/-9 activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 330, p. 1306-131, 2005.

TANG, J. W.; PILLAY, D. Transmission of HIV-1 drug resistance. **Journal of Clinical Virology**, v. 30, p.1-10, 2004.

TAKAHASHI M.; UEDA J.; SASAKI J. I. The components of the plants of Lagerstroemia genus. V. Synthesis of the aglycon of lagertannin 3,4-di-O-methylellagic acid from gallic acid. **Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 97, p. 1236-1239, 1977.

TAUCHI, T.; OHYASHIKI, K. Molecular mechanisms of resistance of leukemia to imatinib mesylate. **Leukemia Research**, v. 28, p. 39-45, 2004.

TEIXEIRA, A.; MORFIM, M. P.; CORDOVA, C. A. S. de; CHARÃO, C. C. T.; LIMA, V. R. de; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Melatonin protects against pro-oxidant enzymes and reduces lipid peroxidation in distinct membranes induced by the hydroxyl and ascorbys radicals and by peroxinitrite. J. **Pineal Research**, v. 35, p. 1-7, 2003.

THOMAS, C. E.; KALYANARAMAN, B. **Oxygen Radicals and the Disease Process**. Amsterdam: Copyright, 1997.

THOMPSON, P. E.; MOORE, A. M.; REINERTSON, J. W.; Antimalarial activity of α -resorcylic acid and analogs and reversal by p-hydroxybenzoic acid. **Antibiotics and Chemotherapy**, v. 3, p. 399-408, 1953.

TIEN, M.; BERLETT, B. S.; LEVINE, R. L.; CHOCK, P. B.; STADTMAN, E. R. Peroxynitrite-mediated modification of proteins at physiological carbon dioxide concentration: pH dependence of carbonyl formation, tyrosine nitration, and methionine oxidation. **Biochemistry**, v. 96, p.7809-7814, 1999.

TRIPATHI, S. C.; DIXIT, S. N. Fungitoxic properties of Rosa chinesis Jacq. **Experientia**, v. 33, p. 207-209, 1977.

TORSSEL, K. B. G. **Natural Product Chemistry. A mechanistic biosynthetic and ecological approach**. Stockholm: Swedish Pharmaceutical Press, 2 ed., 1997.

VALENTÃO, P.; FERNANDES, E.; CARVALHO, F.; ANDRADE, P. B.; SEABRA, R. M.; BASTOS, M. L. Studies on the Antioxidant Activity of *Lippia citriodora* Infusion: Scavenging Effect on Superoxide Radical, Hydroxyl Radical and Hypochlorous Acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n.10, p. 1324—1327, 2002.

VERPOORTE, R.; MEMELINK, J. Engineering secondary metabolite production in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 181-187, 2002.

VIVOT, E.; MUÑOZ, J. de D.; CRUAÑES, M. Del C.; CRUAÑES, M. J.; TAPIA, A.; HIRSCHMANN, G. S.; MARTÍNEZ, E.; SAPIO, O. di; GATTUSO, M.; ZACCHINO, S. Inhibitory activity of xantine-oxidase and superoxide scavenger properties of *Inga verna* subsp. *affinis*. Its morphological and micrographic characteristics. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 65-71, 2001.

WAGNER, B. A.; BUETTNER, G. R.; BURNS, C. P. Free radical-mediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. **Biochemistry**, v. 33, p. 4449-4453, 1994.

WALLING, C. ; PARTCH, R. E.; WEIL, T. Kinetics of the decomposition of hydrogen peroxide catalysed by ferric ethylenediaminetetraacetate complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 72, p. 140-142, 1975.

WERNER, D.; WILHELM, B.; PAUL-ERNST, F. **Fungicidal carbamic acid esters of gallic acid**. Alemanha (1977), 22 páginas. Código: GWXXBX DE 2529648 19770120. Patente escrita em alemão.

WILHEM-FILHO, D.; DA SILVA, E. L.; BOVERIS, A. Flavonóides Antioxidantes de Plantas Medicinais e Alimentos: Importância e Perspectivas Terapêuticas. In: Yunes, R. A.; Calixto, J. B. **Plantas Medicinais sob o Óptica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó:Argos, 2001, 500 p.

WILSCHUT, J.; HOEKSTRA, D. Membrane fusion: lipid vesicles as a model system. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 40, p. 145-166, 1986.

WINTERBOURN, C. C. Comparative reactivities of various biological compounds with myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride, and similarity of the oxidant to hypochlorite. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 840, p. 204-210, 1985.

WINTERBOURN, C. C. Biological reactivity and biomarkers of the neutrophil oxidant, hypochlorous acid. **Toxicology**, v. 181, p. 223-227, 2002.

WINTERBOURN, C. C.; VAN DEN BERG, J. J. M.; ROITMAN, E.; KUYPERS, F. A. Chlorohydrin formation from unsaturated fatty acids reacted with hypochlorous acid. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 295, p. 547-555, 1992.

WHITEMAN, M.; SPENCER, J. P. E.; JENNER, A.; HALLIWELL, B. Hypochlorous Acid-Induced DNA Base Modification: Potentiation by Nitrite: Biomarkers of DNA Damage by Reactive Oxygen Species. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 257, p. 572-576, 1999.

www.dadairs.com/liposomes.htm, DADAIRS-LIPOSOMES, acessado em 30 de julho de 2005.

YAN, L. J.; TRABER, M. G.; KOBUCGI, H.; MATSUGO, S.; TRISHLER, H. J.; PACKER, L. Efficacy of hypochlorous acid scavenger in the prevention of protein carbonyl formation. **Archives in Biochemistry and Biophysics**. v. 327, p. 330-334, 1996.

YANG, L.; LEE, C.; YEN, K. Induction of apoptosis by hydrolyzable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemia cells 2000. **Cancer Letters**, v.157, p. 65-75, 2000.

YAO, Y.; YIN, D.; JAS, G. S.; KUCZERA, K.; WILLIAMS, T. D.; SCHÖNEICH, C.; SQUIER, T. C. Oxidative Modification of a Carboxyl-Terminal Vicinal Methionine in Calmodulin by Hydrogen Peroxide Inhibits Calmodulin-Dependent Activation of the Plasma Membrane Ca-ATPase. **Biochemistry**, v. 35, p. 2767 – 2787, 1996.

YEAGLE, P. L. **The Membrane of Cells**. California: Academic Press, 1993.

YEN, G. C.; DUH, P. D.; TSAI, H. L. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. **Food Chemistry**, v. 79, p. 307–313, 2002.

YEO, J. F. Does nitric oxide play a role in orofacial pain transmission? **Annals of the New York Academy of Sciences**. V. 962, p.151-160, 2002.

YIN, J. J.; SMITH, M. J.; EPPLEY, R. M.; PAGE, S. W.; SPHON, J. A. Effects of fumonisin B1 on lipid peroxidation in membranes. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 1371, p. 134-142, 1998.

YORITAKA, A.; HATTORI, N.; UCHIDA, K.; TANAKA, M.; STADTMAN, E. R.; MIZUNO, Y. Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. **Proceedings of the National Academy Sciences of United States of America**, v. 93, p. 2696-2701, 1996.

ZAVODNIK, I. B.; LAPSHINA, E. A.; ZAVODNIK, L. B.; SOSZYNSKI, M.; BARTOSZ, G.; BRYSEWSKA, M. Hypochlorous acid-induced oxidative damage of human red blood cells: effects of *tert*-butyl hydroperoxide and nitrite on the HOCl reaction with erythrocytes. **Bioelectrochemistry**, v. 58, p. 127-135, 2002.

ZHAO, J.; DAVIS, L. C.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 23, p. 283-333, 2005.

9. *Anexos*

SAVI, L. A.; LEAL, P. C.; VIEIRA, T. O.; ROSSO, R.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; BARARDI, C. R.; SIMOES, C. M. Evaluation of anti-herpetic and antioxidant activities, and cytotoxic and genotoxic effects of synthetic alkyl-esters of gallic acid. *Arzneimittelforschung*. 2005;55(1):66-75.

ROSSO, R.; LICINIO, M. A.; SOUZA, C. A. DE; SOUZA, N. A. DE; BAZZO, M. L.; SANTOS-SILVA, M. C.; LEAL, P. C., YUNES, R. A., NUNES, R., CRECZYNSKI-PASA, T. B. Relationship between lipophilicity and cytotoxic effect of gallic acid n-alkyl-esters on leukemic lymphoblastic cells I-1210. In: XXXIV Reunião anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Águas de Lindóia, Brasil, 2005. Divulgação digital, programas e resumos, 2005.

ROSSO, R.; LOCATELLI, C.; LICÍNIO, L.; SOUZA, C. A. DE; SANTOS-SILVA, M. C.; LEAL, P. C.; YUNES, R. A.; NUNES, R.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Influence of glutathione depletion and nf-kb inhibition on the cytotoxic effect of n-alkyl-ester of gallic acid in I-1210 leukemic cells. In: IV Meeting of the South American Group of the Society for Free Radical Biology and Medicine, Águas de Lindóia, Brasil, 2005. Divulgação digital, program and abstract, 2005.

ROSSO, R. ; LUCKEMEYER, D. ; REGINATTO, F. H. ; LEAL, Paulo César ; YUNES, Rosendo Augusto ; NUNES, Ricardo José ; CRECZYNSKI-PASA, Tânia Beatriz . Evaluation of the antioxidant potential and antibacterial activity of N-Alkyl-Esters of gallic acid. In: Second workshop on Comparative Aspects of Oxidative Stress in Biological Systems, La Paz, México, 2005. Anais do Second workshop on Comparative Aspects of Oxidative Stress in Biological Systems, v. único, p. 28, 2005.

ROSSO, R.; LUCKEMEYER, D. ; KAPPEL, V. D. ; BARELLI, C. ; REGINATTO, F. H. ; LEAL, P. C.; YUNES, R. A.; NUNES, R. J.; CRECZYNSKIPASA, T. B. Avaliação da Atividade Antibacteriana de Compostos sintéticos Derivados do Ácido Gálico. In: XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Florianópolis, Brasil, 2005. Anais do XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2005.

SAVI, L. A ; LEAL, P. C. ; ROSSO, R. ; VIEIRA, T. O. ; YUNES, R. A. ; NUNES, R. J. ; BARARDI, C. R M ; SIMÕES, C. M. O. ; CRECZYNSKIPASA, T. B. In vitro action of N-alkyl-esters of gallic acid against lipid peroxidation and as free radical scavenger. In: XII Biennial Meeting of the society for Free Radical Research International, 2004, Buenos Aires, Argentina. Program and Abstracts - Addendum. Newton : Elsevier Incorporation, v. 36, p. 17, 2004.

ROSSO, R.; YUNES, R. A.; LEAL, P. C.; NUNES, R. J.; BOECK, P. ; REGINATTO, F. H.; KAPPEL, V. D.; CRECZYNSKIPASA, T. B. Screening of antioxidant and antibacterial activities of chalcones, acetophenones and eugenols synthetically obtained.. In: XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu, Brasil, 2004. Programas e Resumos, 2004.

ROSSO, R.; REGINATTO, F. H. ; BARELLI, C. ; LUCKEMEYER, D. ; KAPPEL, V. D. ; LEAL, P. C.; YUNES, R. A.; NUNES, R. J.; CRECZYNSKIPASA, T. B. Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana de compostos fenólicos sintéticos.. In: XXXVIII Congresso Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial, Florianópolis, Brasil, 2004. Anais do XXXVIII Congresso Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial, 2004.

SAVI, L. A.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C. M. O.; ROSSO, R. ; VIEIRA, T. O.; CRECZYNSKIPASA, T. B. Evaluation of the potential antioxidant activity of phenolic compounds. In: XXXVI Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, Águas de Lindóia, Brasil, 2004. Anais do XXXVI Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, v. 1, p. 286, 2004.

SAVI, L. A ; LEAL, Paulo C.; ROSSO, R. ; VIEIRA, T. O.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C. M. O.; CRECZYNSKIPASA, T. B. Evaluation of the potential antioxidant activity of n-alkyl-esters of gallic acid. In: XXXVI Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental., Águas de Lindóia, Brasil, 2004. Anais do XXXVI Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, v. 1, p. 286, 2004.

ROSSO, R.; LEAL, P. C.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; BOECK, P. ; LIMA, V. R.; CRECZYNSKIPASA, T. B. Avaliação da atividade antioxidante e da citotoxicidade de chalconas, acetofenonas e eugenóis obtidos sinteticamente. In: XI Encontro de Química da Região Sul, Pelotas, Brasil, 2003. Anais do XI Encontro de Química da Região Sul, v. 1, p. Q-08, 2003.